



FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA
BIOLOGISCH-PHARMAZEUTISCHE FAKULTÄT

**Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung der Apoptose
in der Pathogenese von Cocksackievirus B3-Infektionen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biochemikerin Ulrike Martin
geboren am 28.5.1975 in Jena

Oktober 2006

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2A	2A-Protease
3C	3C-Protease
α-	anti-x (Antigen x zur Generierung spezifischer Antikörper)
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
AP	Alkalische Phosphatase (gekoppelt an sekundäre Antikörper)
bp	Basenpaare
CARD	caspase recruitment domain
Casp	Caspase
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate
CVB3	Coxsackievirus B3
Cyt C	Cytochrom C
DD	death domain
DED	death effector domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DsRed	rot fluoreszierendes Korallenprotein aus <i>Discosoma genus</i>
DsRedStar	stärker fluoreszierende Variante des DsRed-Proteins
DTT	Dithiothreitol
EGFP	enhanced green fluorescent protein (Variante des grün fluoreszierenden Proteins aus der Qualle <i>Aequorea Victoria</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
H ₂ O	Wasser (bidestilliert und autoklaviert)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
His ₆ -tag	6 Histidin-Reste (für die affinitätschromatographische Proteinaufreinigung)
HRV	humanes Rhinovirus
hu	human
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
M	molar
MCS	multiple cloning site
mRNA	messenger RNA
mu	murin
nt	Nukleotide

NTR	nichttranslatierte Region
OD _{405 nm}	Optische Dichte bei 405 nm
P _{CMV}	Promoter des Cytomegalievirus
PCR	polymerase chain reaction
p. i.	post infectionem
pfu	plaque forming units
PV	Poliovirus
q-VD-o-Ph	quinoline-Valin-Aspartat-(non-O-methylated)-CH ₂ -difluorophenoxy
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur oder „Reverse Transkription“
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> ele <u>e</u> lectrophoresis
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose (50%)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen/min
VP2	Virusprotein 2 (Kapsidprotein)
MW	Mittelwert
ZPE	zytopathischer Effekt
z-VAD-fmk	benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-(O-methyliert)-fluoromethylketon

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZIELSTELLUNG	1
2. EINLEITUNG	
2.1. COXSACKIEVIREN	
2.1.1. Molekularbiologie der Coxsackieviren	2
2.1.2. CVB3 als Krankheitserreger	4
2.2. CVB3-ASSOZIIERTE APOPTOSE IM MAUSMODELL	
2.2.1. Bedeutung der VP2-Siva-Wechselwirkung für die CVB3-induzierte Pathogenese	6
2.2.2. Siva – das proapoptotische Wirtszellprotein	7
2.3. APOPTOSE	10
2.3.1. Caspasen – die zentralen Effektoren der Apoptose	11
2.3.2. Apoptoseinduktion über den Rezeptor-vermittelten, extrinsischen Weg	13
2.3.3. Apoptoseinduktion über den intrinsischen Weg	15
2.4. VIREN UND APOPTOSE	21
3. MATERIAL & METHODEN	
3.1. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	
3.1.1. Zellkultivierung	26
3.1.2. Trypanblau-Färbung und Fixierung	26
3.1.3. Transfektion	27
3.1.4. Infektion	28
3.2. VIROLOGISCHE METHODEN	
3.2.1. Virusvermehrung	29
3.2.2. Viruskonzentrationsbestimmung	29
3.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	
3.3.1. Bakterienkulturen	30
3.3.2. Transformation von <i>E. coli</i> nach der CaCl ₂ -Methode	31
3.3.3. Bakterielle Proteinexpression und -reinigung	31
3.3.4. Proteinisolation und -konzentrationsbestimmung	32
3.3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
3.3.6. Western Blot	33
3.3.7. Aktivitätstest der viralen Proteasen 3C und 2A <i>in vitro</i>	34
3.4. MOLEKULARGENETISCHE METHODEN	
3.4.1. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	34
3.4.2. Agarose-Gelelektrophorese	35
3.4.3. Quantifizierung von DNA und RNA	35
3.4.4. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	36
3.4.5. Real-time PCR	36
3.4.6. Restriktion von Plasmiden und DNA-Fragmenten	37
3.4.7. DNA-Ligation	37
3.4.8. DNA-Sequenzierung	37

3.4.9.	RNA-Isolation aus Zellkulturen.....	38
3.4.10.	Reverse Transkription der Gesamt-mRNA.....	38
3.4.11.	<i>In vitro</i> -Transkription.....	38
3.4.12.	Plasmide und Primer.....	39
3.5.	METHODEN ZUM NACHWEIS VON APOPTOSE	
3.5.1.	Nachweis der Aktivierung von Caspasen.....	42
3.5.2.	Analyse der Cytochrom C-Freisetzung.....	44
3.5.3.	Isolierung chromosomaler DNA zum Nachweis der DNA-Fragmentierung.....	44
3.5.4.	Nachweis der DNA-Fragmentierung mittels ApoAlert™ Ladder Test.....	45
3.5.5.	Zellkernfärbung mit Hoechst-33342.....	45
3.5.6.	Apoptose Gen-Array.....	46
4.	ERGEBNISSE	
4.1.	UNTERSUCHUNG DER SIVA-EXPRESSION <i>IN VITRO</i>	
4.1.1.	<i>Siva</i> -Transkription nach Infektion von 293 Zellen mit CVB3H3 und CVB3H310A1.....	47
4.1.2.	Expression von <i>Siva</i> auf Proteinebene.....	48
4.2.	EXPRESSION DES VP2-KAPSIDPROTEINS UND DES INTERAKTIONS- PARTNERS SIVA	
4.2.1.	Induzierbare Expression mit Hilfe des Tet-On Systems.....	48
4.2.2.	<i>In vitro</i> -Transkription der Kapsidproteine VP2 und VP2H310A1.....	53
4.2.3.	Transiente Expression von VP2 und <i>Siva</i> als Fusionsprotein mit EGFP.....	54
4.2.4.	Etablierung stabiler Zelllinien zur Expression der EGFP-Fusionsproteine.....	56
4.2.5.	Transiente Doppeltransfektion von <i>Siva</i> - und VP2-kodierenden Plasmiden.....	61
4.3.	UNTERSUCHUNG DER INDUKTION APOPTOTISCHER PROZESSE DURCH CVB3H3 UND CVB3H310A1 <i>IN VITRO</i>	
4.3.1.	Kondensierung und Fragmentierung des Chromatins.....	64
4.3.2.	Induktion der Caspase-3 Aktivität.....	65
4.3.3.	Induktion anderer Caspase-Aktivitäten.....	66
4.3.4.	Freisetzung von Cytochrom C.....	71
4.3.5.	Analyse der Expression Apoptose-relevanter Gene mit Hilfe der cDNA-Array Technologie.....	71
4.4.	EINFLUSS DES PAN-CASPASE INHIBITORS Z-VAD-FMK AUF DIE REPLIKATION VON CVB3H3	
4.4.1.	Hemmung des ZPE und Verzögerung des Zelltods durch z-VAD-fmk.....	75
4.4.2.	Inhibierung der Cytochrom C-Freisetzung durch z-VAD-fmk.....	76
4.4.3.	Inhibierung der Virusreplikation durch z-VAD-fmk.....	77
4.4.4.	Einfluss von z-VAD-fmk auf die virale RNA-Synthese.....	78
4.4.5.	Einfluss von z-VAD-fmk auf die virale Proteinsynthese.....	80
4.4.6.	Inhibierung der viralen Protease-Aktivität durch z-VAD-fmk.....	81
4.5.	EINFLUSS VON NICHT METHYLIERTEN CASPASE-INHIBITOREN AUF DIE REPLIKATION VON CVB3H3	
4.5.1.	Wirkung von q-VD-o-Ph auf die virale Protease-Aktivität.....	83
4.5.2.	Einfluss von q-VD-o-Ph auf die Virusreplikation.....	84
4.5.3.	Beeinflussung der Zellvitalität durch q-VD-o-Ph.....	86
4.5.4.	Effekt von q-VD-o-Ph auf die Freisetzung von Cytochrom C.....	87

5.	DISKUSSION	89
5.1.	INDUKTION DER APOPTOSE DURCH CVB3H3 UND CVB3H310A1 <i>IN VITRO</i>	
5.1.1.	Veränderungen der nukleären Morphologie	90
5.1.2.	Nachweis verschiedener Caspase-Aktivitäten	92
5.1.3.	Beteiligung des mitochondrialen und Bedeutung des extrinsischen Apoptose- wegs während der CVB3-Infektion	96
5.1.4.	Unspezifische Inhibierung viraler Proteasen durch den pan-Caspase Inhibitor z-VAD-fmk	98
5.1.5.	Wirkung des pan-Caspase Inhibitors q-VD-o-Ph	101
5.1.6.	Fazit: Enterovirale Infektionen und Apoptose	107
5.2.	EXPRESSION DER INTERAKTIONSPARTNER VP2 UND SIVA	109
6.	ZUSAMMENFASSUNG	114
7.	LITERATUR	116
8.	ANHANG	

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, apoptotische Prozesse, die im Verlauf einer Coxsackievirus B3-Infektion auftreten, *in vitro* zu charakterisieren und damit einen Beitrag zur Aufklärung der bisher nur unvollständig verstandenen Pathogenesemechanismen dieser viralen Erkrankung zu leisten.

Bislang ist die Bedeutung der Apoptose im Verlauf von Picornavirus-Infektionen unklar. In experimentellen Systemen wurden sowohl eine Induktion als auch eine Suppression des apoptotischen Zelltods während viraler Infektionen beschrieben.

Für die Pathogenese ist die Aktivierung dieses Signalwegs von großer Bedeutung. Die frühe Induktion kann durch den vorzeitigen Wirtszelltod die Produktion von Virusnachkommen oder die Etablierung einer persistierenden Infektion verhindern. Von einer ausreichend verzögerten Ausführung des apoptotischen Programms kann das Virus dagegen profitieren, indem es innerhalb der membranumhüllten apoptotischen Zellfragmente freigesetzt wird. Diese werden in benachbarte Zellen aufgenommen, wodurch eine effiziente Verbreitung der Viren ermöglicht wird und gleichzeitig ein gewisser Schutz des Virus vor der Inaktivierung durch das Immunsystem gegeben ist.

Für die Charakterisierung apoptotischer Prozesse während der CVB3-Infektion *in vitro* waren folgende Fragestellungen zu untersuchen:

- Sind apoptotische Zellveränderungen im Verlauf einer CVB3H3-Infektion zu beobachten?
- Welche Signalwege sind bei einer Induktion der Apoptose beteiligt?
- Ist die Ausführung des apoptotischen Programms für die Replikation und Zytopathogenität von CVB3H3 von Bedeutung?
- Inwieweit ist das proapoptotische Wirtszellprotein Siva an einer CVB3-induzierten Apoptose beteiligt?
- Kann aus der Wechselwirkung des viralen Kapsidproteins VP2 mit Siva eine Erklärung für die unterschiedliche Pathogenität der Virusvarianten CVB3H3 und CVB3H310A1 *in vivo* abgeleitet werden?

2.1. Coxsackieviren

Coxsackieviren (CV) sind ubiquitär vorkommende humanpathogene Viren, die in Abhängigkeit von unterschiedlichen histopathologischen Befunden in Mäusen in die Gruppen A (CVA; 23 Serotypen) und B (CVB; 6 Serotypen) unterteilt werden. Die erste Beschreibung dieser Krankheitserreger erfolgte 1948 durch Dalldorf und Sickles, die ein Virus der Gruppe A bei Kindern aus der amerikanischen Kleinstadt Coxsackie (Bundesstaat New York) nachwiesen, das Fieber und Lähmungserscheinungen verursachte [43]. Kurze Zeit später fand die erste Isolierung eines Virus der CVB-Gruppe statt [123].

Bei humanen Infektionen mit CVB wird nach einer Inkubationszeit von 10-14 Tagen ein weites Spektrum an klinischen Symptomen beobachtet, das von asymptomatischen Verläufen (bei ca. 80%) über leichte Erkältungskrankheiten und fiebrige grippeähnliche Symptome bis hin zu schwerwiegenden akuten und chronischen Krankheitsverläufen wie Myokarditis, Encephalitis, Meningitis, Pankreatitis oder Hepatitis reicht [220, 125].

2.1.1. Molekularbiologie der Coxsackieviren

Coxsackieviren werden in die Familie der *Picornaviridae* eingeordnet und gehören innerhalb dieser Familie zum Genus *Enterovirus*. Als typische Vertreter bilden Coxsackieviren 28-30 nm große ikosaederförmige Partikel ohne Lipidhülle, die jeweils ein einzelsträngiges

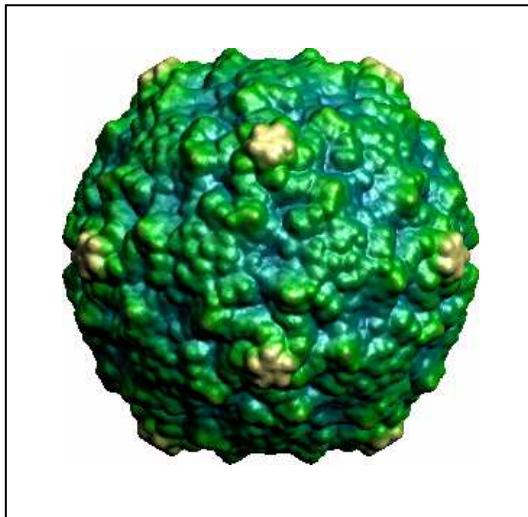


Abb. 1: 3D-Modell der CVB3-Struktur (Variante Gauntt) nach Röntgenkristallographie [127].

RNA-Genom in Plusstrang-Orientierung umschließen (Abb. 1). Dieses Viruskapsid besteht aus 60 Protomeren und jedes dieser Protomere setzt sich aus den 4 Strukturproteinen VP1-VP4 zusammen, wobei VP1-VP3 die Oberfläche des Kapsids bilden und VP4 an der Innenseite direkt mit der viralen RNA assoziiert ist. Diese RNA (7400 nt bei CVB3) ist am 5'-Ende kovalent mit einem kleinen, viralen Protein („VPg“, 3B-Peptid) verknüpft und am 3'-Ende polyadenyliert. Sie kodiert für ein Polyprotein (2185 AS), das co-translational durch die Aktivität der viralen Proteasen zu den 11 viralen Proteinen prozessiert wird. Der kodierenden Sequenz vor- und nachgeschaltet sind nichttranslatierte

Regionen (5'- bzw. 3'-NTR), die spezifische RNA-Sekundärstrukturen ausbilden und von Bedeutung sind bei der Replikation bzw. Translation der viralen RNA.

Das Polyprotein wird in drei Bereiche eingeteilt, in denen die Anordnung der Proteine bei allen Picornaviren gleich ist. Die P1-Region kodiert für die vier Strukturproteine des Kapsids (VP4, VP2, VP3 und VP1), die P2-Region für drei (2A, 2B, 2C) und die P3-Region für vier Nichtstrukturproteine (3A, 3B, 3C, 3D). Die Prozessierung erfolgt durch die viralen Proteasen 2A und 3C sowie das 3CD-Vorläuferprotein (Abb. 2).

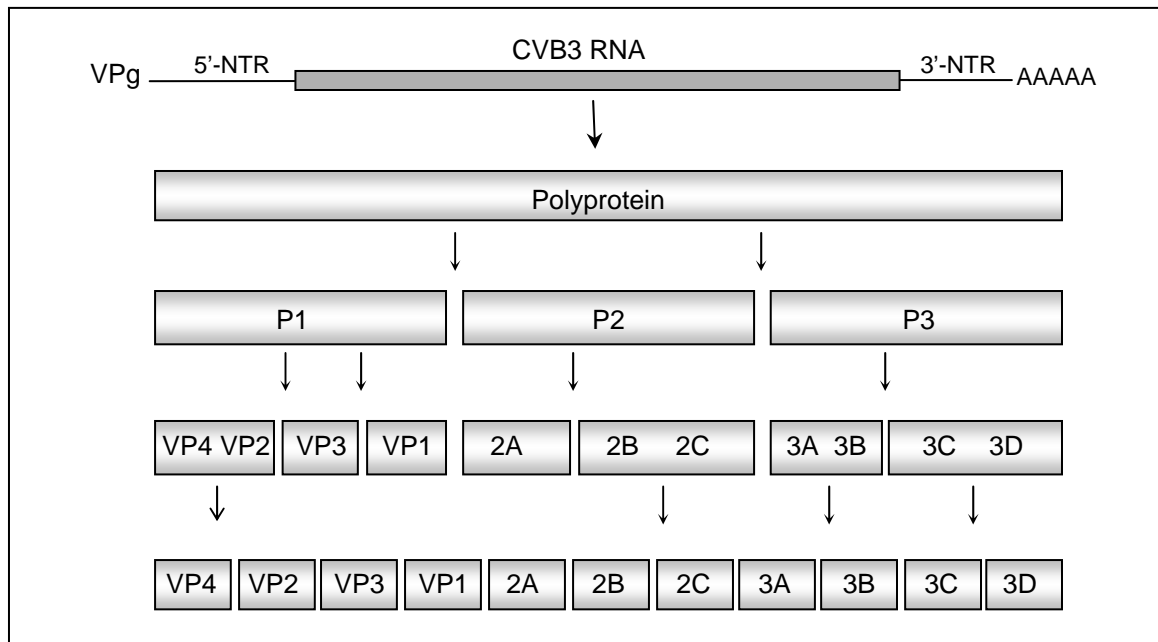


Abb. 2: Enterovirale Polyproteinprozessierung. Das Plusstrang-RNA-Genom wird direkt in ein Polyprotein translatiert, das in der P1-Region die Strukturproteine und in den P2- und P3-Regionen die funktionellen Proteine enthält. Die Abspaltung der P1-Region erfolgt durch die Aktivität der 2A-Protease, die weiteren proteolytischen Schritte werden durch die 3C-Protease bzw. das 3CD-Vorläuferprotein katalysiert. Der Mechanismus der Prozessierung von VP4-VP2 ist noch unklar und geschieht autokatalytisch oder über eine RNA-katalysierte Spaltung.

Für die Infektion einer Zelle erfolgt die Adsorption von CVB an ein 46 kDa großes Protein, das als Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) bezeichnet wird [17, 200]. Als Co-Rezeptor, der zwar die Bindung, aber nicht den Eintritt von CVB in die Zelle ermöglicht, kann der „decay-accelerating factor“ (DAF) dienen [175, 18]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass neben CAR auch spezifisch modifizierte Heparansulfate auf der Zelloberfläche den Eintritt von CVB3 in die Zellen ermöglichen können [236, 237].

Die virale RNA wird nach der Destabilisierung des Kapsids über Öffnungen, die sich an den Ikosaederecken ausbilden, in das Zytoplasma ausgeschleust. Das Viruskapsid kann dabei entweder an die Zelloberfläche gebunden sein oder sich nach der Endozytose in Vesikeln im Zytoplasma befinden. Da das virale Genom als RNA in Plusstrang-Orientierung vorliegt, kann direkt die Translation erfolgen. Dabei besitzt die virale RNA im Gegensatz zu den eukaryotischen mRNAs keine 5'-Cap-Struktur, die zur korrekten Bindung der ribosomalen Untereinheiten an den Translationsstartpunkt dient. Dies wird stattdessen durch eine stabile Sekundärstruktur in der 5'-NTR, die „interne Ribosomen-Eintrittsstelle“ (IRES), ermöglicht. Bei der Bindung der IRES sind zelluläre Proteine, die auch die Zell- und Wirtsspezifität der

verschiedenen Picornaviren bestimmen, von Bedeutung [125]. Nach der Prozessierung des Polyproteins liegen die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (3D) und das VPg (3B) als Voraussetzung für die Replikation des viralen Genoms in der infizierten Zelle vor, die im Zytoplasma an Membrankompartimenten stattfindet. In einem ersten Schritt erfolgt die Synthese einer komplementären Negativstrang-RNA, wobei ein uridinyliertes 3B-Peptid (VPg-pUpU-OH) als Primer verwendet wird, der mit dem Poly-A-Teil am 3'-Ende des viralen Genoms assoziiert. Das kurzzeitig entstehende Zwischenprodukt aus doppelsträngiger RNA wird mit Hilfe der viralen Proteine 2BC und 2C getrennt, die an das 3'-Ende des neusynthetisierten Negativstrangs binden [12, 13]. Die Helikase-Aktivität des 2C-Proteins führt zur Freilegung zweier Adenosinreste am 3'-Ende des Negativstrangs, an die sich die VPg-pUpU-OH Primer anlagern und so die Bildung neuer genomischer RNA-Positivstränge initiieren können.

Der Zusammenbau viraler Proteine und RNA-Genome zu infektiösen Viruspartikeln erfolgt durch Selbstassemblierung, wobei sich jeweils 5 Aggregate aus den Strukturproteinen VP4-VP2, VP3 und VP1 zu Pentameren zusammenlagern. Aus je 12 dieser Pentamere entstehen anschließend die Kapsidvorläufer, die das RNA-Genom einschließen. Die Enkapsidierung der RNA führt zu Umlagerungen in der Proteinstruktur der Prokapside und zur Spaltung von VP4-VP2.

Während der Virusreplikation wird der zelluläre Stoffwechsel stark beeinflusst. Die virale 2A-Protease spaltet die eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF4G1/II und verhindert damit die cap-abhängige Translation zellulärer mRNA [60]. Weitere Substrate sind das Zytoskelettprotein Dystrophin [10] oder das an der Translationsinitiation beteiligte Poly(A)-bindende Protein (PABP), das auch von der 3C-Protease gespalten wird [93, 87]. Die Aktivität der 3C-Protease führt in Enterovirus-infizierten Zellen ebenfalls zur Spaltung des TATA-bindenden Proteins [38] und der Transkriptionsfaktoren TFIIIC [37], CREB [223] und Oct-1 [225], so dass es zur Inhibierung der Transkription der RNA-Polymerasen I, II und III kommt [224]. Auch andere virale Proteine, wie das 2B oder 3A, beeinflussen die Wirtszelle durch Veränderungen des Transports und der Sekretion zellulärer Glykoproteine, der Struktur des Endoplasmatischen Retikulums oder der Permeabilität zellulärer Membranen [125, 54, 205]. Diese Vorgänge führen zum Abschalten des Zellstoffwechsel („host cell shut-off“) und zu morphologischen Veränderungen der Zellstruktur und werden im Mikroskop als zytopathischer Effekt sichtbar. Die infizierten Zellen ziehen sich zusammen, runden sich ab und lösen sich aus dem Zellverband.

2.1.2. CVB3 als Krankheitserreger

Bei einer oralen Infektion mit Coxsackieviren passieren diese, wie alle Enteroviren, aufgrund ihrer Säurestabilität ungeschädigt den Verdauungstrakt und replizieren in den Peyerschen

Plaques – dem lymphatischen Gewebe des Darmbereichs. Nach der ersten Virämie verbreiten sich die Erreger über das Blut und infizierte Lymphozyten im Organismus und siedeln sich in den verschiedenen Zielorganen an. Die unterschiedliche Manifestation der Infektion hat ihre Ursache in verschiedenen Faktoren, zu denen neben Genetik und Virulenz des Erregers [66, 97] auch eine Reihe von Wirtsfaktoren wie Alter [94], Geschlecht [82], genetischer Hintergrund [148] und Immunstatus des Wirts [32] gehören.

In ca. 10% der Enterovirusinfektionen kommt es zur Ausbildung klinischer Symptome einer akuten Myokarditis. Während sich die Mehrzahl der Patienten davon erholt, wobei es aber nur bei ca. 35% der Erkrankten zu einer vollständigen Ausheilung der Krankheit kommt, kann die akute Entzündung in ca. 20% der Fälle in einen chronischen Krankheitsverlauf übergehen [116]. Umfangreiche klinische Analysen weisen darauf hin, dass CVB, vor allem der Typ B3 (CVB3), zusammen mit anderen Enteroviren der Familie der *Picornaviridae*, bis zu 50% der akuten Myokarditiden verursachen und mit ca. 25% an der Entstehung der chronischen Folgeerkrankung – dem Krankheitsbild der Dilatativen Kardiomyopathie – beteiligt sind [118]. Jährlich werden allein in den USA ca. 100.000 neue Fälle dieser progredient verlaufenden Herzinsuffizienz diagnostiziert, die in 50% der Fälle einen letalen Ausgang hat und nur mit einer Herztransplantation therapiert werden kann [22]. Die wahrscheinliche Durchseuchungsrate der Bevölkerung mit CVB3 wird mit bis zu 70% angenommen [8, 119].

Trotz der gut charakterisierten Struktur und Genomfunktion von CVB3 sind wichtige Aspekte der virusinduzierten Pathogenese noch unklar. DNA-Mikroarray- und Proteomuntersuchungen verdeutlichen die komplexe Antwort der Wirtszellen auf die CVB3-Infektion sichtbar an unterschiedlich exprimierten metabolischen, mitochondrialen, immunregulatorischen und Zellstrukturgenen [194, 152]. Um die CVB3-induzierten Krankheitsprozesse besser zu verstehen, wurden murine Modelle etabliert, mit denen es möglich ist, gezielte Aspekte der Infektion zu untersuchen, da das Virus Mäuse mit einer dem Menschen ähnlichen Organpräferenz infiziert. Trotzdem ist es bis heute nicht gelungen, eine virusspezifische Prophylaxe oder Therapie der akuten bzw. chronischen CVB3-induzierten Myokarditis in der Klinik zu etablieren. Es gibt Ansätze, die zum einen auf die Inhibierung der Virusreplikation und zum anderen auf die Unterstützung der Elimination infizierter Zellen durch die Immunantwort zielen. Zur ersten Möglichkeit gehören Substanzen wie Pleconaril, das durch die Besetzung der hydrophoben Tasche der Rezeptorbindungsstelle zu Konformationsänderungen des Viruskapsids führt, wodurch die Bindung an zelluläre Rezeptoren verhindert wird [158, 167]. Daneben stellen auch die Immunglobulin-Therapie, d. h. die Verabreichung von neutralisierenden Antikörpern, oder die Behandlung mit Interferon- β vielversprechende Ansätze dar [191, 98]. Auch die aktive Immunisierung unter Verwendung von attenuierten oder rekombinanten Viren oder die Verwendung von DNA-Impfstoffen wurde bereits im Tiermodell erfolgreich untersucht [75, 76, 239].

Bei der Pathogenese der CVB3-induzierten Herzerkrankung des Menschen sind in Analogie zu anderen Viruserkrankungen sowohl direkte virusbedingte Schädigungen des Myokards als auch immunologische Reaktionen des infizierten Wirtes von Bedeutung. Nach der anfänglichen hämatogenen Infektion kardialer Myozyten breitet sich diese innerhalb des Gewebes aus, wobei es zu einem direkten zytopathischen Effekt kommt, der zum Zelluntergang führt [173]. Anschließend infiltrieren Zellen der unspezifischen Immunantwort (Makrophagen, Natürliche Killerzellen) das Gewebe, wobei sich im weiteren eine starke Entzündungsreaktion unter Beteiligung von einwandernden T-Helferzellen ($CD4^+$) und zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) ausbildet und es zur Eliminierung des Virus kommt. Durch die Ausbildung von Doppelstrang-RNA-Molekülen ist das virale Genom jedoch in der Lage, in einer Reihe von Zellen zu persistieren und damit, auch ohne die Bildung infektiöser Viruspartikel, einen langanhaltenden chronischen Krankheitsprozess zu induzieren [65, 192, 218].

Ein weiterer Aspekt CVB3-verursachter Herzscheidigungen ist in der Induktion der Apoptose zu sehen. Bei Patienten mit chronischer Myokarditis konnten apoptosebedingte Zellschädigungen im Myokard gezeigt werden [138], wobei es bislang unklar ist, inwieweit das Virus alleine oder die induzierte Immunantwort und die dadurch hervorgerufene lokale Zytokinfreisetzung an den beobachteten Apoptoseprozessen beteiligt ist. Ein möglicher Ansatzpunkt zur Aufklärung des Mechanismus besteht in der Wechselwirkung des viralen Kapsidproteins VP2 und des proapoptotischen Wirtszellproteins Siva [74].

2.2. CVB3-assoziierte Apoptose im Mausmodell

2.2.1. Bedeutung der VP2-Siva-Wechselwirkung für die CVB3-induzierte Pathogenese

Die Grundlage für diese Arbeit entstand aus der Suche nach Interaktionspartnern zwischen viralen und Wirtszellproteinen, um weitere Kenntnisse über die komplexe CVB3-induzierte Pathogenese zu erhalten. Dabei wurde mit Hilfe des Hefe-Zweihybrid-Systems eine cDNA-Bank aus HeLa-Zellen nach Interaktionspartnern für die viralen Kapsidproteine VP1 und VP2 sowie die virale Protease 2A durchsucht und die Wechselwirkung des VP2-Proteins mit dem proapoptotischen Wirtszellprotein Siva detektiert [74]. Die Interaktion dieser beiden Proteine war jedoch spezifisch für CVB3 und trat nicht bei Verwendung der VP2-Proteine zweier anderer Picornaviren (Poliovirus Typ 1, Theilers Encephalomyelitisvirus der Maus) auf, die ebenfalls Apoptose induzieren können. Der Vergleich der humanen und murinen Siva-Sequenz zeigte eine hohe Identität und auch für das murine Siva-Protein (muSiva) konnte im Hefe-Zweihybrid-System die Interaktion mit VP2 nachgewiesen werden, so dass eine weitere Untersuchung der VP2-Siva-Wechselwirkung im Mausmodell möglich war. Dabei wurde zum einen eine erhöhte Transkription von *siva* in Pankreas- und Herzgewebe nach Infektion mit

CVB3 nachgewiesen, zum anderen wurden immunhistochemisch apoptotische Zellen in Gewebearealen detektiert, die ebenfalls positiv für virale RNA und Siva mRNA waren. Die Bedeutung der Beteiligung des proapoptotischen Proteins Siva an der Induktion der Apoptose im Verlauf einer CVB3-Infektion wurde durch weitere Experimente verdeutlicht. Dafür wurde neben der pathogenen, kardiotropen CVB3H3-Variante das CVB3H310A1-Virus [204] untersucht. Dieses Virus unterscheidet sich von CVB3H3 nur durch die Substitution einer einzelnen Aminosäure, bei der ein Asparagin (an Position 165) im VP2-Protein durch ein Aspartat ersetzt wurde [97]. Damit verbunden sind eine reduzierte Kardiotropie und Replikation von CVB3H310A1 *in vivo* sowie Unterschiede in der Induktion zellulärer Immunantworten in der Maus [114, 83]. Die Untersuchungen von Henke et al. (2001) zeigten, dass das VP2-Protein von CVB3H310A1 (VP2H310A1) im Gegensatz zu dem von CVB3H3 nicht mehr in der Lage war, *in vitro* effizient an Siva zu binden. Gleichzeitig führte die Infektion mit CVB3H310A1 zu einer geringeren Zerstörung von Pankreas-Gewebe mit deutlich weniger apoptotischen Zellen im Mausmodell. Weitere Analysen ergaben, dass CVB3H310A1 im Unterschied zu CVB3H3 nicht in der Lage war, die Transkription von *siva* in Pankreas-, Blut- und Herzzellen zu induzieren und dass die Virusausbreitung ausgehend vom Pankreas über das Blut zu den sekundären Organen Milz und Herz beeinträchtigt war. Damit könnte die fehlende Fähigkeit des VP2H310A1-Proteins zur Interaktion mit Siva, verbunden mit einer fehlenden Induktion der *siva*-Transkription und verringerter Apoptose, zumindest teilweise verantwortlich sein für die geringere Pathogenität und die verschlechterte Ausbreitung von CVB3H310A1 im Vergleich zur CVB3H3-Variante [75].

2.2.2. Siva – das proapoptotische Wirtszellprotein

Siva wurde 1997 durch Prasad et al. erstmalig beschrieben, die mit Hilfe des Hefe-Zweihybrid-Systems nach Proteinen suchten, die durch ihre Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne des CD27-Rezeptors für dessen Übertragung apoptotischer Signale verantwortlich sein könnten [146]. CD27 gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren (s. 2.3.2.), besitzt aber im Gegensatz zu anderen Mitgliedern dieser Familie nicht die intrazelluläre Domäne („death domain“), die für die Induktion des Apoptose-Signalweges notwendig ist. Die Autoren klonierten einen offenen Leserahmen von 189 Aminosäuren und nannten die Sequenz „Siva“. Für das Siva-Protein (20 kDa) wurde durch Sequenzvergleiche für die zentrale Region eine „death domain“-ähnliche Struktur postuliert, während der C-Terminus Homologien zu B-Box- und Zn-Finger-Proteinen aufweist. Die Expression von Siva mRNA wurde in verschiedenen Zelllinien und Geweben nachgewiesen, eine Überexpression von Siva führte zur Induktion der Apoptose, detektiert durch die Fragmentierung chromosomaler DNA [146]. Nachfolgend wurden weitere Studien zur Funktion des Siva-Proteins veröffentlicht, deren teils widersprüchliche Ergebnisse noch kein

klares Bild bezüglich der Signalwege zulassen, die der Siva-induzierten Apoptose zugrunde liegen bzw. auf vielfältige Wirkungsweisen des Proteins in Zellen des Immunsystems, Tumorzellen oder Nervenzellen hinweisen.

1999 wurde aus Maus-Zelllinien eine zweite Spleißform des *siva*-Gens isoliert, Siva-2, bei der das zweite der 4 Exons des Gens deletiert ist, wodurch die „death domain“-ähnliche Region nahezu vollständig entfernt wird. Obwohl für Siva-2 ebenfalls die Bindung an CD27 nachgewiesen wurde, führte die Überexpression von Siva-2 im Gegensatz zum Volllänge Siva-1 nicht zur DNA-Fragmentierung. Die Autoren spekulierten, dass Siva-2 als dominanter Inhibitor der Siva-1 induzierten Apoptose dienen könnte [232]. Eine weitere Arbeit dieser Gruppe postuliert, dass durch oxidativen Stress eine Aktivierung der Tyrosinkinase Arg erfolgt, wodurch über einen Siva-1-abhängigen Mechanismus Apoptose induziert werden kann. Es wurde gezeigt, dass Siva-1 mit der Tyrosinkinase Arg interagiert und durch diese phosphoryliert wurde (Tyr an der Position 48). Die proapoptotischen Eigenschaften von Siva-1 waren inhibiert in Arg-defizienten Zellen oder bei Mutation des Tyr48. Obwohl Siva-2 in gleicher Weise durch Arg phosphoryliert wurde, führte dies nicht zu einer gesteigerten Induktion der Apoptose [29]. Mit zwei weiteren Arbeiten demonstrierte die Gruppe eine neue Funktion von Siva. Darin wurde gezeigt, dass Siva-1 in der Lage ist, mit den antiapoptotischen Proteinen Bcl-x_L und Bcl-2 (s. 2.3.3.) zu interagieren und die Zellen dadurch für eine UV-Strahlen-vermittelte Induktion der Apoptose zugänglich zu machen. Dies wurde durch das Auftreten apoptotischer Zellkerne sowie der Translokation von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol und der Aktivierung der Caspase-9 nachgewiesen. Vermittelt wird diese Fähigkeit durch eine konservierte Region von 20 Aminosäuren, die im Exon 2 (und am N-Terminus der in den vorigen Arbeiten postulierten „death domain“-ähnlichen Region) lokalisiert ist und für die die Struktur einer amphipathischen Helix („SAH“) vorhergesagt wurde. Die SAH-Domäne war ausreichend für die Interaktion mit Bcl-x_L und Bcl-2 und das Fehlen von Exon 2 im Siva-2 Protein die Ursache für dessen fehlende Interaktion mit diesen Proteinen. Die Autoren wiesen in ihrer Arbeit ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisierung und Assoziation von Siva-1 mit den Mitochondrien nach. Siva-1 scheint demnach durch die Inhibierung der Funktion von Bcl-2 und Bcl-x_L am mitochondrial-induzierten Apoptoseweg (s. 2.3.3.) beteiligt zu sein [222, 36]. Kürzlich veröffentlichte die Gruppe eine weitere Arbeit, in der durch Anwendung der siRNA-Technologie die Expression von endogenem Siva in T-Zelllinien inhibiert wurde. Dadurch wurde eine offensichtlich negative Regulierung der NF-κB-Aktivität durch Siva aufgehoben und die Zellen waren resistent gegenüber Apoptose-Signalen, die aus einer Stimulierung der T-Zellrezeptoren resultierten. Ein Einfluss auf die Fas-induzierte Apoptose war jedoch nicht nachweisbar [68].

CD27 ist nicht das einzige Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie, das mit Siva interagieren kann. Im Jahr 2002 wurde von Spinicelli et al. gezeigt, dass auch für das „glucocorticoid-

induced TNFR-related gene“ (GITR) eine Wechselwirkung mit Siva möglich ist. GITR und 2 weitere Rezeptoren (4-1BB und OX40) bilden aufgrund der ausgeprägten Homologie ihrer kurzen zytoplasmatischen Domänen zusammen mit CD27 eine Subfamilie innerhalb der TNFR-Superfamilie und auch für 4-1BB und OX40 wurde ausgehend von *in vitro*-Studien eine Interaktion mit Siva postuliert [183]. Im Gegensatz dazu wurde bei Untersuchungen an Myelomazelllinien keine Bindung von Siva und CD27 nachgewiesen. Eine Induktion der Apoptose durch CD27 konnte auch nicht mit Hilfe eines cDNA-Arrays detektiert werden, wobei aber eine Reduktion der *siva*-Transkription auftrat [89]. In der Arbeit von Nestler et al. (2006) wurde die Interaktion von Siva mit CD27 näher untersucht und gezeigt, dass für die Bindung von Siva dessen N-terminale und nicht, wie bis dahin spekuliert, die C-terminale Domäne relevant ist. Die Bindung an CD27 erfolgte nicht bei Deletion der TRAF2-Bindestelle des Rezeptors, so dass Siva und TRAF2 (s. 2.3.2.) mit der gleichen Region des Rezeptors interagieren. Weiterhin wurde die Bindung von 3 Zn-Ionen durch Siva nachgewiesen, was auf eine komplexe dreidimensionale Struktur des Proteins hindeutet, sowie die Interaktion mit einem neuen Protein, dem peroxisomalen Transmembranprotein PMP22 beschrieben [131].

2003 wurde am Beispiel von humanen Darmkrebszellen durch die Verwendung eines cDNA-Arrays gezeigt, dass die *siva*-Transkription durch das Tumorsuppressor-Protein p53 hochreguliert wurde [44]. Auch Experimente mit murinen neuronalen Zellen bestätigten dieses Ergebnis einer p53-abhängigen erhöhten Synthese von muSiva-mRNA. Bei der Analyse der regulatorischen Sequenzen des *siva*-Gens wurden, neben 2 mutmaßlichen p53-Bindungsstellen im Intron 1, auch 2 Bindungsstellen für den Tumorsuppressor E2F in der Promoterregion gefunden. Detaillierte Untersuchungen dieser Bindungsstellen ergaben, dass p53 und E2F unabhängig voneinander die *siva*-Transkription induzieren können. Sequenzanalysen zeigten, dass, ähnlich wie im murinen Gen auch, im humanen *siva*-Gen 4 Bindungsstellen für E2F in der Promoterregion und 3 Bindungsstellen für p53 in den Introns 1, 2 und 3 konserviert sind [62].

Py et al. (2004) untersuchten detailliert den proapoptotischen Mechanismus von Siva-1 und Siva-2 in T-Lymphozyten. Die Überexpression von Siva-1 resultierte in der Induktion von Apoptose, die durch die Expression und Aktivierung von CD27 noch erhöht wurde. Bei der Siva-induzierten Apoptose wurde sowohl die Beteiligung des extrinsischen (durch die Aktivierung der Initiator-Caspase-8 und die Spaltung des Substratproteins Bid) als auch die des intrinsischen Apoptoseweges (anhand von Cytochrom C-Freisetzung und Aktivierung der Initiator-Caspase-9) detektiert, die zur Aktivierung der gemeinsamen Effektor-Caspase-3 führten. Ein Nachweis der direkten Interaktion von Siva mit der Caspase-8 war nicht möglich, so dass Siva bei der CD27-Rezeptor-vermittelten Caspase-8-Aktivierung wahrscheinlich ein weiteres Adapterprotein benötigt. Im Gegensatz zu Xue et al. (2002) [222] wurde die Lokalisierung von Siva nicht an den Mitochondrien, sondern im Zellkern nachgewiesen,

wobei nach anfänglich diffuser nukleoplasmatischer Verteilung mit zunehmender Transfektionsdauer eine punktuelle Akkumulierung des Proteins in der Peripherie des Nukleus auftrat. Ebenfalls im Gegensatz zu Xue et al. (2002) und Yoon et al. (1999) [232] konnte gezeigt werden, dass auch Siva-2 proapoptotische Eigenschaften besitzt und die zentrale Region (mit der SAH-Domäne sowie der „death domain“-Region) nicht für die Apoptoseinduktion in T-Zellen notwendig ist. Vielmehr wird die nukleäre Lokalisierung durch die N-terminale und die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion sowohl durch die N-terminale als auch durch die C-terminale Domäne kodiert. Die Autoren spekulieren aufgrund der Unterschiede zu anderen Arbeiten eine Zelltyp-abhängige Beteiligung von Siva an unterschiedlichen Apoptosewegen [147].

2.3. Apoptose

Das Absterben einer Zelle kann das Resultat zweier Prozesse sein – der Nekrose oder der Apoptose. Die Nekrose ist ein passiver Vorgang, der durch die Einwirkung toxischer Stoffe zu schweren Schädigungen der Zelle führt. Die strukturelle Integrität, insbesondere der Organellen und der Plasmamembran, wird zerstört, so dass es zum Austritt des Zellinhalts in die Umgebung kommt und nachfolgend in der Regel durch Immunzellen eine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird.

Im Gegensatz dazu stellt die Apoptose den aktiven, geordneten Abbau einer Zelle aus sich selbst heraus dar, deren Überreste von Makrophagen oder benachbarten Zellen aufgenommen werden können, ohne Entzündungsprozesse in der Umgebung hervorzurufen. Die Kontrolle der Zellzahl durch die Apoptose ist für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen vielzelliger Organismen unerlässlich, um Zellen zu eliminieren, die überflüssig sind oder die durch Schädigungen, wie Mutationen oder Infektionen, eine potentielle Gefahr für den gesamten Organismus darstellen. Defekte in den Signalwegen dieses programmierten Zelltods sind mit einer Vielzahl von Erkrankungen verbunden, wobei als Ursache sowohl zwischen unzureichender Apoptose (z. B. bei Krebs- und Autoimmunerkrankungen, persistierende Infektionen) als auch übermäßiger Apoptose (Neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Huntington-Chorea, Herzversagen oder Typ I Diabetes) unterschieden werden kann [153].

Zu den Signalen, die zur Induktion von Apoptose führen können, gehören u. a. die Bindung von Liganden an bestimmte Plasmamembran-Rezeptoren, Wachstumsfaktor-Mangel, Schäden durch Strahlung (UV, Gammastrahlen) oder Chemikalien, Oxidantien und Virusinfektionen. Unabhängig von der Art des Stimulus kommt es aber zu einheitlichen morphologischen Veränderungen während des Prozesses: dem Schrumpfen von Zytoplasma und Zellkern, mit der Kondensierung des Chromatins zu globulären oder sichelförmigen Strukturen sowie der Fragmentierung der DNA, Veränderungen in der

Zusammensetzung der Plasmamembran, Zerstörung von Organellstrukturen und letztlich dem Zerfall der Zelle in membranumhüllte Vesikel, die von anderen Zellen aufgenommen werden können.

Im Folgenden soll ein Überblick über die verschiedenen Wege zur Induktion und Regulation der Apoptose gegeben werden. Die Induktion des programmierten Zelltods kann auf zwei Arten erfolgen, durch zellexterne oder durch zellinterne Signale. Das Ziel beider Wege stellt in erster Linie die Aktivierung spezieller Proteasen („Caspasen“) dar, die durch die Spaltung zahlreicher Substrate für die Ausführung der Apoptose verantwortlich sind. Daneben existieren aber auch Caspase-unabhängige Mechanismen, die ebenfalls für den programmierten Zelltod verantwortlich sein können.

2.3.1. Caspasen – die zentralen Effektoren der Apoptose

Caspasen (Casp), eine Familie von Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen, werden in der Zelle als inaktive Enzymvorläufer synthetisiert. Sie bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne, gefolgt von einer großen (~20 kDa, p20) und einer kleinen Untereinheit (~10 kDa, p10) [196]. Ihre Einteilung in 3 Gruppen erfolgt anhand ihrer Funktion und der Struktur ihrer Prodomänen. Während zur Gruppe I die inflammatorischen Caspasen (Casp-1, -4, -5, -13) gehören, die für die Prozessierung pro-inflammatorischer Zytokine verantwortlich sind, sind die Caspasen der Gruppe II und III für die Apoptose von Bedeutung. Die Gruppe II besteht aus den Initiator-Caspasen (Casp-2, -8, -9, -10, -12) mit großen Prodomänen, die entweder CARD- („caspase recruitment domain“) oder DED- („death effector domain“) Motive tragen [103]. Proapoptotische Signale führen zur Interaktion dieser Regionen mit homologen Domänen von Adapter- oder Gerüstproteinen und zur Ausbildung von komplexen Strukturen (z. B. DISC und Apoptosom, s. 2.3.2. und 2.3.3.). Dadurch kommt es an diesen Komplexen zur Oligomerisierung von pro-Caspasemolekülen und ihrer anschließenden autokatalytischen Aktivierung. Diese aktivierten Initiator-Caspasen führen dann zur Prozessierung der sogenannten Effektor-Caspasen, den Caspasen der Gruppe III (Casp-3, -6, -7) mit kurzen Prodomänen, die durch die Spaltung vieler Substrate für den eigentlichen Abbau der Zelle verantwortlich sind [133, 176, 21] (Abb. 3).

Die aktiven Caspasen bestehen aus einem Heterotetramer ($p20_2$ - $p10_2$) mit 2 aktiven Zentren an entgegengesetzten Enden des Moleküls. Ihre jeweils spezifische Substrat-Erkennungssequenz umfasst 4 Aminosäuren ($X\text{-Glu-X-Asp}^V$), wobei die Proteolyse nach dem C-terminalen Aspartat erfolgt [197, 149]. Während der Apoptose wird nur ein kleiner Anteil der zellulären Proteine gespalten, deren Anzahl auf ungefähr 200 geschätzt wird [23]. Durch ihre Spaltung wird der strukturelle Abbau der Zelle ermöglicht (z. B. durch die Proteolyse der Zytoskelett- oder Kernmatrixproteine Aktin, Fodrin, Gelsolin, Lamin) und die Aufrechterhaltung der Genomintegrität verhindert (z. B. durch die Spaltung des DNA-

Reparaturenzyms PARP, der Topoisomerase I, der Kinase DNA-PK oder die Aktivierung der DNase CAD). Auch für viele regulatorische Proteine wie Kinasen (PKC, MEKK-1, FAK, Akt1 u. a.) und Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, STAT1, Sp1 u. a.) wurde eine Prozessierung nachgewiesen [133 und Referenzen darin].

Viele Details der kaskadenartigen Aktivierung der Caspasen konnten bisher aufgeklärt werden. Im extrinsischen Rezeptor-vermittelten Signalweg führt die Ausbildung des DISC an der Plasmamembran zur Aktivierung der Caspase-8. Während in Typ I-Zellen die Caspase-8 in der Lage ist, direkt die Effektor-Caspase-3 zu aktivieren, ist in Typ II-Zellen dazu eine Amplifikation über den mitochondrialen Apoptoseweg nötig. Dabei induziert das von der Caspase-8 gespaltene tBid die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und dadurch die Ausbildung des Apoptosoms, was in der Aktivierung der Caspase-9 und darüber in der Aktivierung der Caspase-3 resultiert [230, 103]. Slee et al. (1999) untersuchten in Zellextrakten die Kaskade der Aktivierung von Effektor-Caspasen durch die Caspase-9. Dabei zeigte sich, dass die Caspase-9 neben der Caspase-3 auch die Caspase-7 prozessiert. Die Caspase-3 führt dann zum einen in einer positiven Feedback-Schleife zur Caspase-9-Aktivierung und zum anderen zur Aktivierung von Caspase-6 und Caspase-2. Von diesen ist die Caspase-6 in der Lage, Caspase-8 und Caspase-10 zu aktivieren [180]. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 funktionell nicht redundant waren und fast ausschließlich erstere für die Substratspaltungen verantwortlich war [179].

Andere Daten zeigten, dass es in der ER-induzierten Apoptose zur Translokation der Caspase-7 an das ER und der Prozessierung der dort lokalisierten pro-Caspase-12 kommt. Die aktive Caspase-12 kann dann, unabhängig von Cytochrom C, pro-Caspase-9 aktivieren [151].

Neuere Daten belegen weiterhin, dass auch die Caspase-2 als Initiator-Caspase aktiviert werden kann. Dabei führt die von p53 aktivierte Transkription des Adapterproteins PIDD („p53-induced protein with a death domain“) und dessen Assoziation mit dem Adapter CRADD („caspase and RIP adapter with death domain“) zur Ausbildung eines multimeren Proteinkomplexes (dem „PIDDosom“), der die pro-Caspase-2 rekrutiert und aktiviert. Diese führt dann zur Spaltung von Bid und dadurch zur Induktion des mitochondrialen Apoptosewegs [198].

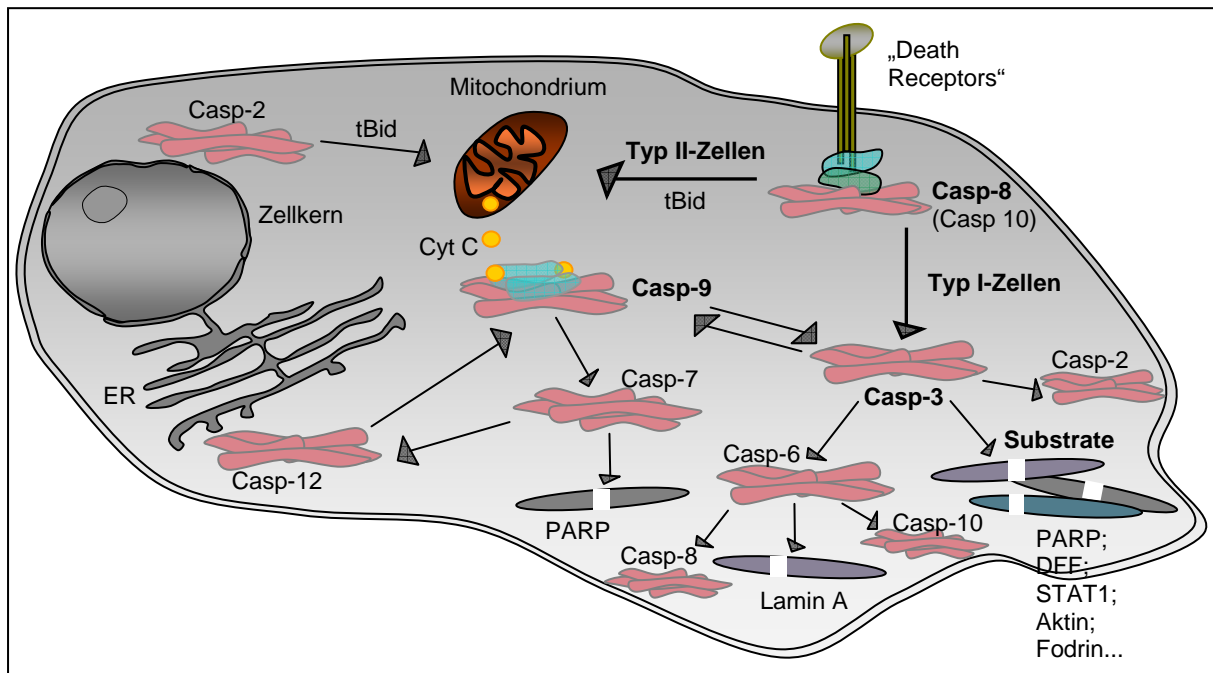


Abb. 3: Möglichkeiten der kaskadenartigen Aktivierung der Caspasen, ausgelöst von extrazellulären Signalen („Death Receptors“) oder intrazellulären Signalen (ausgehend z. B. vom Mitochondrium, Zellkern, Endoplasmatischem Retikulum).

2.3.2. Apoptoseinduktion über den Rezeptor-vermittelten, extrinsischen Weg

Signale für die Zellproliferation und Differenzierung und insbesondere für die Apoptose werden durch Rezeptoren der Tumornekrosisfaktor (TNF) Rezeptor Superfamilie übermittelt, die durch ihre charakteristischen, extrazellulären Sequenzabschnitte von 2-5 Cystein-reichen Domänen definiert ist. Die Mitglieder dieser Superfamilie können hinsichtlich ihrer intrazellulären Domänen in 2 Gruppen unterschieden werden, abhängig davon, ob sie die „Todesdomäne“ („death domain“, DD), eine homologe Sequenz von 80 Aminosäuren, besitzen [182, 193]. Da die DD für die Weiterleitung apoptotischer Signale unerlässlich ist, werden die entsprechenden Rezeptoren als „Todesrezeptoren“ („death receptors“) bezeichnet. Zu ihnen gehören CD95 („Fas“), TNFR1, DR3, DR4 und DR5, die sich durch ihr Expressionsmuster und in Einzelheiten der Signaltransduktion unterscheiden. Die Bindung der spezifischen Liganden (CD95L; TNF; Apo3L und TRAIL für DR4 bzw. DR5) als Homotrimer führt zur Trimerisierung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die intrazellulär in der Assoziation ihrer Todesdomänen resultiert. Dies ermöglicht die Bindung von Adapterproteinen, die ebenfalls Todesdomänen besitzen (FADD: „Fas-associated death domain“; TRADD: „TNF receptor-associated death domain“). Während FADD im Falle von CD95 direkt mit dem Rezeptor interagiert, erfolgt im Falle des TNFR1 und DR3 erst eine Bindung von TRADD an den Rezeptor und nachfolgend die Bindung von FADD. FADD ist nun in der Lage, durch eine weitere Domäne („death effector domain“, DED) die pro-Caspase-8 zu rekrutieren und so den sogenannten „death-inducing signalling complex“ („DISC“) auszubilden. Die dadurch bedingte Oligomerisierung der pro-Caspase-8 führt zu

ihrer autokatalytischen Aktivierung und Freisetzung ins Zytosol, wo sie durch die Spaltung anderer Caspasen und Substrate das apoptotische Programm einleitet [1, 9, 21]. Ein Substrat der Caspase-8 ist Bid, ein Mitglied der Bcl-2 Familie, das nach seiner Spaltung die Freisetzung proapoptotischer Proteine aus den Mitochondrien induzieren und damit den extrinsischen an den intrinsischen Apoptoseweg (s. 2.3.3.) koppeln kann [106, 115]. Auch die Aktivierung der pro-Caspase-10 über den DISC wurde beschrieben [96, 213]. Ebenso wurde die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der pro-Caspase-2 vorgeschlagen, für die neben TRADD weitere DD-enhaltende Adaptermoleküle nötig sind – RIP („receptor-interacting protein“) und CRADD. Dabei ermöglicht die Bindung von CRADD an RIP die Rekrutierung der pro-Caspase-2 über das gemeinsame CARD-Motiv („caspase recruitment domain“) [57, 5].

Eine Regulierung der proapoptotischen Signalübertragung dieser Rezeptoren ist auf verschiedene Arten möglich, wozu u. a. die sogenannten „decoy“-Rezeptoren und das Protein „cFLIP“ [„cellular caspase-8 (FLICE)-like inhibitory protein“] gehören. Die decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 konkurrieren mit DR4 und DR5 um die Bindung des gemeinsamen Liganden TRAIL, verhindern aber durch ihre Struktur eine Signalweiterleitung. Während DcR1 ein an der Zellmembran verankertes Zelloberflächenprotein ohne zytoplasmatische Domäne ist, ähnelt DcR2 den Rezeptoren, besitzt aber im Vergleich zu ihnen eine verkürzte zytoplasmatische Domäne [9]. cFLIP ist ein Caspase-8-Homolog für das verschiedene Spleißvarianten beschrieben wurden. cFLIP_S besteht aus 2 DED-Motiven, gefolgt von ca. 20 Aminosäuren, die relevant für dessen Ubiquitylierung sind [201, 145]. cFLIP_L besitzt neben den DED's einen Caspase-8-ähnlichen C-Terminus, allerdings ohne entsprechende Caspase-Aktivität durch die Substitution essentieller Aminosäuren [25]. Während cFLIP_S als dominant negativer Regulator der Caspase-8 dient, da es durch seine DED's an FADD binden und die Rekrutierung der pro-Caspase-8 zum DISC inhibieren kann, ist die Wirkung von cFLIP_L komplexer. Einerseits kann auch cFLIP_L die Bindung der pro-Caspase-8 an FADD und damit die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Caspase-8 inhibieren, andererseits findet aber auch die Bildung von Heterodimeren aus cFLIP_L und pro-Caspase-8 statt. Als Resultat dieser Heterodimerisierung ist sowohl eine begrenzte Aktivierung der Caspase-8 möglich [35, 124] als auch die Rekrutierung der Adaptermoleküle RIP und TRAF2 („TNFR-associated factor 2“), die zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB führt [88, 55]. Die Wirkung von cFLIP_L umfasst demnach neben der Inhibierung der Rezeptor-vermittelten Apoptose die Rekrutierung von Adapterproteinen, die zur Aktivierung von NFκB-Signalwegen führen sowie eine begrenzte Aktivierung der Caspase-8, die für die Proliferation vieler Zelltypen wichtig zu sein scheint [25].

Die Todesrezeptoren sind nicht nur zur alleinigen proapoptotischen Signalübertragung in der Lage, sondern ebenso fähig, das Überleben von Zellen zu stimulieren. Dabei wirkt das Adapterprotein TRADD nicht als Plattform für die Bindung von FADD, sondern rekrutiert die

Proteine RIP und TRAF2, was über verschiedene Proteinkinase-Kaskaden zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B oder c-Jun führt [9].

Neben den Todesrezeptoren umfasst die TNFR Superfamilie eine zweite Gruppe, deren Mitgliedern (z. B. TNFR2, CD40, CD27, GITR, 4-1BB und OX40) die intrazelluläre „death domain“ fehlt und die daher hauptsächlich zur Übertragung stimulatorischer Signale dienen [159, 160, 80]. Dazu assoziieren sie über die TRAF-Domäne mit verschiedenen TRAF-Signalmolekülen und führen zur Aktivierung von NFκB oder c-Jun. Wie bei den Todesrezeptoren gibt es auch für diese Gruppe Beispiele, die zeigen, dass einige Mitglieder auch andere Signalfunktionen übernehmen können. So konnte für CD27 und GITR nachgewiesen werden, dass sie durch die Assoziierung mit dem proapoptotischen Protein Siva, für das eine „death domain“-ähnliche Region postuliert wurde, zur Induktion der Apoptose führen können [146, 183].

2.3.3. Apoptoseinduktion über den intrinsischen Weg

Obwohl die Mitochondrien eine zentrale Rolle in diesem Weg einnehmen, gibt es vermehrt Beweise, dass auch andere Organellen wie das Endoplasmatische Retikulum, die Lysosomen oder der Golgi-Apparat als Sensoren für Veränderungen dienen können und für die Induktion der Apoptose von Bedeutung sind (Abb. 4). Dabei findet zwischen diesen Organellen ein Signalaustausch statt, der die lokalen Prozesse miteinander verbindet und

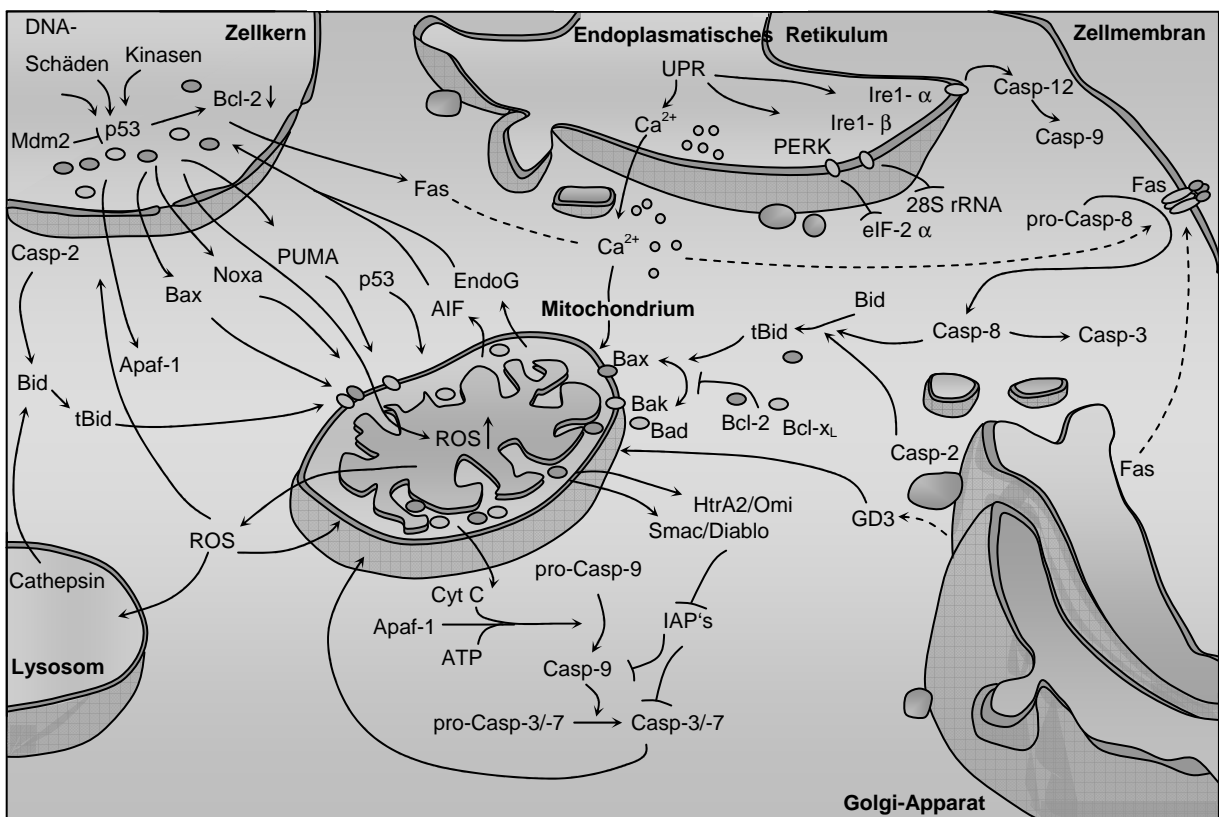


Abb. 4: Signalübertragung während des programmierten Zelltods über den extrinsischen und den intrinsischen Apoptoseweg und die intrazelluläre Kommunikation der Organellen. (Abb. nach Ferri & Kroemer, 2001 [61]) Nähere Beschreibung der Vorgänge im Text.

zur Aktivierung eines gemeinsamen Apoptosewegs führt.

Die Rolle der Mitochondrien in der Apoptose:

Zahlreiche proapoptotische Signale führen zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und damit zur Freisetzung verschiedener Proteine aus dem Intermembranraum in das Zytosol, wo sie ihre Apoptose-aktivierenden Funktionen, sowohl Caspase-abhängig als auch -unabhängig, ausüben können.

Cytochrom C

Die Freisetzung von Cytochrom C (Cyt C) führt zur Bindung an Apaf-1 („apoptotic activating factor“), ein zytosolisches Protein mit einer CARD-Domäne („caspase recruitment domain“). Durch die Bindung von Cyt C erhöht sich die Affinität von Apaf-1 zur Bindung von dATP oder ATP, wodurch die Ausbildung eines oligomeren Komplexes, des sogenannten „Apoptosoms“, ermöglicht wird [111, 242]. Innerhalb des Apoptosoms wird die CARD-Domäne von Apaf-1 exponiert und führt zur Rekrutierung von pro-Caspase-9 Molekülen und deren anschließender Autokatalyse innerhalb dieses Komplexes. Durch die Spaltung weiterer Caspasen leitet die Caspase-9 den proteolytischen Abbau der Zelle ein [214]. Neben Cyt C mit seiner Schlüsselrolle gibt es weitere Proteine, die wichtige Funktionen im mitochondrial-vermittelten Apoptoseweg besitzen.

Smac/Diablo

Das Vorläuferprotein von Smac/Diablo [„second mitochondria-derived activator of caspases“ (human)]/„direct IAP binding protein with low pI“ (murin)] besitzt ein N-terminales Mitochondrien-Lokalisierungssignal, das nach dem Transport des Proteins ins Mitochondrium abgespalten wird [56, 209]. Der neu entstandene N-Terminus stellt mit der Sequenz „Ala-Val-Pro-Ile“ ein sogenanntes IAP-Bindemotiv dar. Über diese Domäne kann Smac/Diablo mit den „IAP's“ („inhibitor of apoptosis proteins“) interagieren [33], zu den bekanntesten gehören XIAP, c-IAP1 und c-IAP2. IAP's haben die Fähigkeit, aktivierte Caspasen zu inhibieren [166, 50]. Für diese Funktion besitzen sie eine oder mehrere sogenannte „BIR“-Domänen (BIR1-BIR3; „baculovirus IAP repeat“). Während die Bindung von XIAP an die aktivierte Caspase-9 durch seine BIR3-Domäne erfolgt [186], dient die BIR2-Domäne mit der vorangehenden Linker-Sequenz zur Bindung der aktivierten Caspasen-3 und -7 [81, 155, 34].

Smac/Diablo ist in der Lage, als Dimer sowohl an die BIR3- als auch an die BIR2-Domäne von XIAP zu binden und ermöglicht damit die Freisetzung der aktiven Caspasen-9, -3 und -7 [33, 185].

Diese Regulation erlaubt eine weitere Kontrolle der Caspase-Aktivität. Auch wenn es durch eine transiente oder versehentliche Cyt C-Freisetzung zur Spaltung der Caspase-9 (und anderer Caspasen) kommt, wird deren Aktivität durch hohe Konzentrationen der IAP's inhibiert. Erst bei anhaltenden proapoptotischen Signalen führt die weitere Freisetzung von Smac/Diablo zu deren Inaktivierung und der Freigabe aktiver Caspasen, die den

apoptotischen Prozess fortsetzen können. Obwohl die Rezeptor-aktivierte Caspase-8 nicht durch XIAP inhibiert werden kann, ist durch die IAP-vermittelte Inaktivierung der Caspase-3 (als gemeinsamer Effektorcaspase beider Wege) auch der extrinsische Apoptoseweg inhibierbar. Erst eine permanente Stimulierung der Todesrezeptoren, die über Bid eine andauernde Freisetzung von Smac/Diablo aus den Mitochondrien ermöglicht, hebt diese Inhibierung auf [155, 214].

HtrA2/Omi

Dieses Protein gehört wie Smac/Diablo zu den IAP-Inhibitoren und besitzt ein N-terminales IAP-Bindemotiv, das mit XIAP interagieren kann [190]. Im Unterschied zu Smac/Diablo besitzt HtrA2/Omi (als Homolog zu dem bakteriellen HtrA [high temperature requirement protein A]) aber zusätzlich eine Serinprotease-Aktivität, die neben der IAP-Bindung von Bedeutung für die proapoptotische Funktion ist [210, 72, 226].

Apoptose-induzierender Faktor

Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) ist ein mitochondriales Protein mit Ähnlichkeit zu bakteriellen Oxidoreduktasen, das wie Cyt C zwei Funktionen zu haben scheint – als mitochondriale Elektronentransferase und als Apoptoseinduktor. AIF besitzt ein Kern-Lokalisierungssignal, so dass es nach der Freisetzung aus den Mitochondrien in den Zellkern wandert und dort Caspase-unabhängig das erste Stadium der Chromatin-Kondensierung und DNA-Fragmentierung (50-300 kb Fragmente) einleitet [189, 121, 227]. Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt, eine eigene DNase-Aktivität für AIF konnte nicht nachgewiesen werden [188]. Da AIF eine DNA-Bindungsdomäne besitzt, wird angenommen, dass durch diese Bindung die Kondensierung des Chromatins erfolgt, andere Chromatin-assoziierte Proteine verdrängt werden und die anschließende DNA-Fragmentierung, entweder aktiv durch die Rekrutierung von Nukleasen oder passiv durch eine erhöhte Zugänglichkeit der Nukleasen, gefördert wird [227].

Endonuklease G

Wie AIF ist die mitochondriale DNase Endonuklease G (Endo G) nach ihrer Freisetzung in der Lage, in den Kern zu wandern und dort Caspase-unabhängig DNA in 50-300 kb große Fragmente zu spalten [107, 207]. Untersuchungen an *Caenorhabditis elegans* lassen darauf schließen, dass Endo G und AIF dabei zusammenarbeiten [141].

Die Regulierung der Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien: Bcl-2 Familie

Die über 20 Mitglieder der Bcl-2 Familie können in 3 Gruppen eingeteilt werden, wobei alle mindestens eine der 4 BH-Domänen (BH1-BH4, „Bcl-2 homology domain“) besitzen. Dabei steht die erste Gruppe, deren Mitglieder (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1 u. a.) eine antiapoptotische Wirkung besitzen, den anderen beiden Gruppen mit proapoptotischen Funktionen gegenüber. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich strukturell. Die „multi-BH“-

Domän-Proteine (Bax, Bak und Bok) besitzen 3 der BH-Domänen (BH1-BH3), während in den „BH3-only“-Proteinen (Bid, Bad, Bik, Puma, Noxa u. a.) nur die kurze BH3-Domäne konserviert ist [1, 2].

Homo- und Heterodimerisierungen zwischen den einzelnen Mitgliedern der Bcl-2 Familie über ihre BH-Domänen sowie ihre Lokalisierung spielen eine essentielle Rolle in der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran [229, 92].

Die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie befinden sich in der Außenmembran der Mitochondrien und inhibieren die Funktion der proapoptotischen Proteine Bax/Bak, die in der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran besteht. Während Bax im Zytosol lokalisiert ist und nach seiner Aktivierung erst die Translokation zu den Mitochondrien erfolgt, befindet sich Bak bereits in der äußeren Mitochondrienmembran [79, 91]. Konformationsänderungen von Bax/Bak resultieren in der Permeabilisierung der Membran [61]. Wie diese Permeabilisierung erreicht wird – über die Öffnung des VDAC („voltage-dependent anion channel“) oder über die Ausbildung autonomer Poren in der äußeren Membran – ist bisher ungeklärt [120, 235].

Gezeigt wurde, dass die BH3-only-Proteine dabei eine übergeordnete Bedeutung in der Kontrolle dieser Prozesse haben, auch wenn es verschiedene Modelle für ihre Wirkung gibt. So könnten die BH3-only-Proteine über die Inaktivierung der antiapoptotischen Bcl-2 homologen Proteine, über eine Aktivierung der proapoptotischen Bax/Bak Proteine oder über eine Kombination dieser Mechanismen wirken [1].

Für die Regulierung der BH3-only-Proteine wiederum gibt es mehrere Mechanismen. Für die Aktivierung von Bid ist die proteolytische Spaltung durch die Caspase-8 erforderlich, bevor die Translokation von tBid zu den Mitochondrien erfolgt [106, 115]. Bad wird über seinen Phosphorylierungsstatus reguliert [238]. In vitalen Zellen liegt Bad phosphoryliert vor, wodurch es mit 14-3-3-Proteinen interagiert und im Zytosol zurückgehalten wird. Apoptotische Stimuli und die dadurch erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen aktivieren die Phosphatase Calcineurin und dephosphorylieren Bad, was seine Freisetzung und Translokation zu den Mitochondrien ermöglicht [45, 70, 212]. Für andere BH3-only-Proteine (wie Bim, Puma und Noxa) ist eine Regulierung auf Transkriptionsebene bekannt, so dass proapoptotische Stimuli, über p53 u. a. Transkriptionsfaktoren, zu einer erhöhten mRNA-Synthese führen [219, 137, 130].

Die Rolle des Endoplasmatischen Retikulums in der Apoptose:

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist auf mindestens 2 verschiedene Arten an der Apoptoseinduktion beteiligt – durch die „unfolded protein response“ (UPR) und durch den Ca^{2+} -Signalweg [61].

Stress-Signale, die die korrekte Faltung der Proteine im ER beeinträchtigen (z. B. Glukosemangel, gestörte Glykosylierung, Inhibierung des Transports zwischen ER und Golgi-Apparat), führen zur Akkumulierung ungefalteter Proteine im ER-Lumen [142]. Durch

die Bindung dieser Proteine an ein ER-Chaperon (BiP/Grp78) wird dessen Interaktion mit 2 transmembranalen Proteinen (Ribonuklease Ire1- β , Proteinkinase Ire1- α) aufgehoben, wodurch diese aktiviert werden. Dies führt zur Spaltung der 28S rRNA und damit zur Inhibierung der Proteintranslation (Ire1- β) bzw. im Falle des Ire1- α zur Rekrutierung eines Adapterproteins (TRAF2) und darüber entweder zur Aktivierung des JNK-Signaltransduktionswegs [84, 203] oder zur Rekrutierung der pro-Caspase-12 und deren anschließender Aktivierung [128]. Die genauen Mechanismen der Caspase-12-Aktivierung sind noch ungeklärt, eine Autokatalyse [231], die Prozessierung durch die Ca^{2+} -abhängige Cysteinprotease m-Calpain [128] und durch die Caspase-7 wurden beschrieben [151]. Bekannt ist, dass die Caspase-12 in der Lage ist, direkt, ohne Beteiligung des Apoptosoms, die Caspase-9 zu aktivieren [150]. Das bedeutet, dass ER Stress unmittelbar mit der Aktivierung der Caspase-Kaskade verbunden sein kann.

Neben Ire1- α und Ire1- β werden durch ungefaltete Proteine im ER 2 weitere transmembranale Proteine aktiviert (PERK und ATF6). PERK ist eine Kinase, die durch die Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2- α zu dessen Inaktivierung und damit ebenfalls zur Inhibierung der Proteinsynthese führt [142, 61]. ATF6 kann nach seiner Aktivierung (Spaltung) in den Zellkern wandern und dort als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Gene (z. B. von Chaperonen oder anderen Transkriptionsfaktoren) induzieren. Dies kann zur Inhibierung der Bcl-2 Expression und damit zur Induktion der Apoptose führen [122].

Die Speicherung von Ca^{2+} im ER ist eine weitere wichtige Aufgabe dieses Kompartiments, dessen Störung apoptogen wirken kann. Reguliert wird das Ca^{2+} -Level über verschiedene Ca^{2+} -Pumpen und -Kanäle, deren Aktivität auch durch die UPR kontrollierbar ist [19]. Der Ausstrom von Ca^{2+} ins Zytosol stellt ein wichtiges Signal in der Kommunikation zwischen ER und Mitochondrien dar und führt zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran [61]. Wie dieses Signal genau übermittelt wird, ist noch unklar. Es gibt Daten, die eine Beteiligung der Proteine der Bcl-2 Familie belegen. Sowohl für Bcl-2 als auch für Bax und Bak konnte gezeigt werden, dass sie ihre Funktionen auch an der Membran des ER ausüben [69, 7, 241].

Die Rolle des Zellkerns in der Apoptose:

Ein wichtiges Signal für die nukleäre Apoptoseinduktion resultiert aus Schädigungen der DNA. An diese kann das Tumorsuppressor-Protein p53 direkt binden, was zu dessen Aktivierung führt. Aber auch Interaktionen mit verschiedenen Proteinen oder posttranslationale Modifikationen können p53 von der latenten in die aktive Form konvertieren [86]. Dafür sind u. a. verschiedene Proteinkinasen (ATM, DNA-PK, ATR, Chk1, Chk2) verantwortlich, die DNA-Schäden detektieren und zu einer Phosphorylierung von p53 führen [61]. Damit erhöht sich zum einen dessen Stabilität, weil die Interaktion mit dem Inhibitor Mdm2 beeinträchtigt wird, zum anderen verstärkt sich dadurch die

sequenzspezifische Bindung von p53 an die DNA [177, 178]. Dies führt zur Aktivierung der Transkription proapoptotischer Gene (*fas*, *dr5*, *bax*, *nox*, *puma*, *apaf-1* u. a.) sowie von Genen (z. B. *pig3*), die durch die Erhöhung von ROS („reactive oxygen species“) oxidativen Stress und dadurch Apoptose induzieren [139, 221, 178, 137, 233, 126, 144]. p53 ist aber auch in der Lage, unabhängig von seiner Funktion als Transkriptionsaktivator proapoptotisch zu wirken. Dabei spielt zum einen die Fähigkeit von p53 zur Transrepression eine Rolle, so dass die Transkription von antiapoptotischen Genen (wie *bcl-2*) inhibiert wird [211]. Zum anderen kann p53 auch direkt mit Apoptose-induzierenden Proteinen oder deren Interaktionspartnern in Wechselwirkung treten und sie dadurch inaktivieren (z. B. mit den Helikasen XPB, XPD oder mitochondrialem Hsp70) [215, 117]. Neben den „indirekten“, proapoptotischen Signalen, die aus dem Zellkern heraus auf wichtige zelluläre Prozesse wirken oder direkt an die Mitochondrien übermittelt werden, könnte auch unmittelbar die Beteiligung einer Caspase von Bedeutung sein. Obwohl die Aktivierung der Caspase-2 bisher wenig verstanden ist, befindet sich diese überwiegend im Zellkern und im Golgi-Apparat, was für ihre Bedeutung in der Apoptoseinduktion dieser Organellen spricht [135]. Auch wenn die Caspase-2 scheinbar keine weiteren Caspasen aktivieren kann, ist sie wie Caspase-8 in der Lage, Bid zu spalten und damit direkt den mitochondrialen Apoptoseweg zu induzieren [140].

Die Rolle des Golgi-Apparats und der Lysosomen in der Apoptose:

Obwohl die Rolle dieser Organellen in der Apoptose bisher weniger erforscht ist, gibt es Daten für deren Beteiligung an diesem Prozess als Sensoren und Effektoren. So sind einige Apoptose-relevante Proteine an der Membran des Golgi-Apparates angereichert (z. B. Caspase-2; Todesrezeptoren, die normalerweise an der Plasmamembran lokalisiert sind [TNFR1, Fas, DR5] und GD3-Synthase) [16, 240, 46]. Experimente zeigten, dass die Aktivierung von p53 zur Translokation von Fas vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran führt und dass die Synthese des Gangliosids GD3 durch GD3-Synthase und die anschließende Translokation zu den Mitochondrien für die Permeabilisierung deren Membran verantwortlich sein kann [16, 156].

Auch einige der lysosomalen Proteasen (Cathepsine) sind in der Lage, proapoptotisch zu wirken. Diese können zum einen zur Spaltung von Bid und damit zur Induktion des mitochondrialen Apoptosewegs führen und sind zum anderen auch fähig, die DNA isolierter Zellkerne zu fragmentieren [187, 171].

Demnach können in der Zelle verschiedene Organellen spezifische Apoptose-induzierende Signale detektieren und diese an den Rest der Zelle weiterleiten. Dies geschieht entweder durch die lokale Aktivierung von Caspasen (Caspase-12 oder -2) oder durch Signale, die zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran führen. Diese Kommunikation der Organellen untereinander und das Zusammenlaufen ihrer Signale auf die gemeinsamen Effektoren ist

die Ursache dafür, dass die biochemischen Charakteristika und das morphologische Erscheinungsbild von apoptotischen Zellen am Ende des Prozesses unabhängig sind von der Art des Apoptose-induzierenden Signals [61].

2.4. Viren und Apoptose

Zur Abwehr von Virusinfektionen stehen dem Organismus mehrere Strategien zur Verfügung, wozu vor allem die zelluläre und die humorale Immunantwort gehören. Eine weitere Möglichkeit, um die Replikation und Ausbreitung der Viren im Wirt zu verhindern, bietet sich der infizierten Zelle durch die Induktion der Apoptose, wobei die Interferon-vermittelte antivirale Antwort von Bedeutung ist.

Rolle der dsRNA-abhängigen Proteinkinase (PKR)

Durch die Anwesenheit viraler Nukleinsäuren in der Zelle wird die Transkription der Interferone aktiviert, welche über verschiedene Transkriptionsfaktoren (wie STAT1/2 und p48) eine Vielzahl von Genprodukten regulieren [47]. Eines der bekanntesten ist die PKR, die durch die Bindung an doppelsträngige RNA-Intermediate der Virusreplikation aktiviert wird und zur Phosphorylierung des eIF-2 α führt. Dadurch kommt es zur Hemmung der Translationsinitiation, so dass sowohl die zelluläre als auch die virale Proteinsynthese inhibiert wird [105]. Daneben wurde für das phosphorylierte eIF-2 α aber auch eine direkte Apoptose-aktivierende Wirkung nachgewiesen, für die eine alternative Translation proapoptotischer mRNAs verantwortlich sein könnte [85]. Zu weiteren Apoptose-induzierenden Funktionen der PKR gehört die Aktivierung von NF- κ B und p53 [99, 42].

Viele Viren haben Strategien entwickelt, um die Wirkung der PKR zu beeinflussen. Eine Inhibierung erfolgt u. a. durch:

- die Bindung von dsRNA durch virale Proteine, um die dsRNA-abhängige Aktivierung der PKR zu verhindern [z. B. Vacciniavirus: E3L-Protein; Influenza-A-Virus: NS1-Protein; Reovirus: σ^3 -Protein] [161];
- die Blockierung des aktiven Zentrums der PKR [Vacciniavirus: K3L-Protein; Hepatitis-C-Virus: E2-Protein; Baculoviren: PK2-Protein] [64];
- die Degradierung der PKR [Poliovirus] [64];
- die Aktivierung von Phosphatasen (PP1), die eIF-2 α dephosphorylieren und dadurch die PKR-Wirkung aufheben [Herpes simplex Virus 1: γ 32.5-Protein] [90].

Im Gegensatz zu diesen PKR-inhibierenden Mechanismen wurde für das Encephalomyocarditisvirus der Maus (EMCV) gezeigt, dass die PKR-Wirkung bedeutsam für die Virusinfektion war. Wurde die PKR-Expression inhibiert, führte dies zu einer Umwandlung der lytischen in eine persistierende EMCV-Infektion [228].

Der Einfluss auf die PKR-vermittelten Wirkungen ist aber nur ein Aspekt im Zusammenspiel von Virus und Apoptose. Die Forschung der letzten Jahre zeigte, in welchem Umfang Viren

in der Lage sind, die Apoptose zu ihrem Vorteil zu beeinflussen. Dabei kann sowohl die Inhibierung als auch die Induktion des programmierten Zelltods für das Virus Vorteile bieten. Die Unterdrückung oder Verzögerung der Apoptose kann nötig sein, um den vorzeitigen Wirtszelltod zu verhindern und damit die ausreichende Produktion von Virusnachkommen oder aber die Etablierung einer persistierenden Infektion zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu stellt aber auch die Induktion der Apoptose einen effizienten Mechanismus zur Verbreitung der Viren dar. Der resultierende Zerfall der Zelle in membranumhüllte Zellfragmente, die von Nachbarzellen aufgenommen werden, gewährleistet deren Infektion und verhindert gleichzeitig den Angriff der Viren durch das Immunsystem, z. B. in Form von Entzündungsprozessen, neutralisierenden Antikörpern oder Proteasen.

Durch die Vorteile, die beide Strategien bieten, ist es nicht ungewöhnlich, dass ein Virus sowohl für Apoptose-inhibierende als auch -aktivierende Funktionen kodiert, so dass manche dieser „einfachen“ Parasiten einen hohen Grad an Komplexität entwickelt haben, um den apoptotischen Signalweg der Wirtszelle für sich zu nutzen. Bisherige Veröffentlichungen zeigen allerdings, dass hinsichtlich der zugrundeliegenden Mechanismen detailliertere Kenntnisse darüber existieren, auf welche Weise Viren die Apoptose unterbinden. Dazu werden verschiedene Schritte innerhalb der Apoptose-Signalwege blockiert, indem virale Proteine zelluläre Funktionen nachahmen oder sie neutralisieren. Im Folgenden soll ein kurzer Einblick in die Strategien viraler Proteine gegeben werden, dem hauptsächlich die Reviews von Hay & Kannourakis (2002) und Roulston et al. (1999) zugrunde liegen [71, 161, sowie Referenzen darin].

Inhibierung des extrinsischen Apoptosewegs

Die Hemmung der TNFR- oder Fas-Rezeptor-vermittelten Induktion der Apoptose kann beispielsweise erfolgen durch:

- die Reduktion der Rezeptoren an der Zelloberfläche [Adenoviren: E3-10.4K- und E3-14.5K-Protein] [71];
- die Sekretion von Rezeptor-Imitaten, die die Liganden binden und deren Signalweiterleitung unterbinden [Myxomatosevirus: M-T2 Protein; Kuhpockenvirus: CrmB-, CrmC- und CrmD-Protein] [161];
- die Inhibierung der FADD-vermittelten proCaspase-8-Aktivierung durch virale Proteine („vFLIP's“) mit Homologie zu den cFLIP's (s. 2.3.1) [Molluscum-contagiosum-Virus: MC159- und 160-Protein; humanes Herpesvirus 8: K13-Protein] [161];
- die Interaktion von Virusproteinen mit dem Rezeptor-Adapterprotein FADD, um die proapoptotischen Signale zu blockieren [Adenoviren: E1B-19K-Protein] oder durch die Wechselwirkung mit den TRAF-Proteinen die stimulatorischen Signalwege der Rezeptoren zu unterstützen [Epstein-Barr-Virus: LMP-1-Protein] [161].

Inhibierung des mitochondrialen Apoptosewegs

Als eine weitere Möglichkeit zur Unterdrückung der Apoptose wurden Mechanismen beschrieben, welche die Funktion der antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie unterstützen, z. B. durch:

- die Expression von Bcl-2-homologen Proteinen [Adenoviren: E1B-19K-Protein; Epstein-Barr-Virus: BHRF1- und BALF1-Protein; humanes Herpesvirus 8: KSbcl-2-Protein] [161, 71];
- die Induktion der Bcl-2-Expression [Epstein-Barr-Virus: EBNA-4- und LMP-1-Protein] [161, 71];
- den Abbau des proapoptotischen Bak-Proteins [Papillomviren: E6-Protein] [71].

Inhibierung von Caspase-Aktivitäten

Eine Reihe viraler Proteine inhibiert die Apoptose durch die direkte Inaktivierung der Caspasen. Zu diesen Caspase-Inhibitoren gehören z. B.:

- die zu den Serpinen (Familie von Chymotrypsin-ähnlichen Serin-Proteasen) homologen Proteine, die spezifisch an einzelne Caspasen (z. B. Caspase-1 und -8) binden und diese hemmen können [Kuhpockenvirus: CrmA-Protein; Vacciniavirus: B13R-Protein] [161];
- die „vIAP's“ der Baculoviren, deren IAP als typischer Vertreter dieser Proteinfamilie gilt und zur Entdeckung der zellulären IAP's (s. 2.3.2.) führte [Baculoviren CpGV bzw. OpMNPV: Cp-IAP bzw. Op-IAP] [161].

Regulation der Transkription

Abgesehen von der Beeinflussung der Signalwege können Viren auch auf Transkriptionsebene Apoptose-regulierend wirken. Dies geschieht beispielsweise durch:

- die direkte Stimulierung der Expression antiapoptotischer Genprodukte durch virale Proteine [HIV-1 Virus: Tat-Protein; Epstein-Barr-Virus: EBNA-4- bzw. LMP-1-Protein] [161];
- die Aktivierung zellulärer Transkriptionsfaktoren (z. B. NF- κ B) und deren antiapoptotischer Signalwege [humanes T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1: Tax Protein] [161];
- die Inhibierung des p53-Proteins und seiner proapoptotischen Wirkung, wobei wiederum verschiedene Mechanismen unterschieden werden können:
 - die Bindung an den p53-Promoter und damit die Blockierung der p53-Synthese [Hepatitis-C-Virus: Core-Protein] [161];
 - die Inaktivierung von p53 durch die direkte Bindung viraler Proteine [Hepatitis-B-Virus: HBx-Protein; Adenoviren: E1B-55K- und E4orf6-Protein] [161];
 - die Stimulierung des Abbaus von p53 [humane Papillomviren: E6-Protein; Adenoviren: E4orf6/E1B-55K-Proteinkomplex] [161].

Im Gegensatz zu diesen Apoptose-inhibierenden Mechanismen ist das Wissen über die Wirkungsweise viraler Proteine mit Apoptose-induzierenden Funktionen weitaus weniger

detailliert. Darüber hinaus können einzelnen nachgewiesenen Strategien auch nicht in jedem Fall spezifische virale Proteine zugeordnet werden.

Beeinflussung der Rezeptor-vermittelten Signalübertragung

Zu den im Verlauf von Virusinfektionen bereits nachgewiesenen Mechanismen gehören:

- die verstärkte Expression von Komponenten der extrinsischen Signalkette, z. B. der Liganden des TNFR [Hepatitis-B-Virus: pX-Protein] oder des Fas-Rezeptors [HIV-1: Tat- und Nef-Protein] [134, 71] bzw. der Rezeptoren selbst [humane Herpesviren 6/7; HIV-1: Tat-Protein] [161, 71];
- die Blockierung der stimulatorischen, NF- κ B-abhängigen Signalübertragung der Rezeptoren [Hepatitis-C-Virus: Core-Protein] [161].

Regulation der Transkription

Für die Apoptose-Induktion ist ebenfalls die Modulierung der zellulären Transkription durch virale Proteine bedeutsam und geschieht beispielsweise durch:

- die Inaktivierung des Tumorsuppressor-Proteins Retinoblastom, woraus eine Stimulierung des Zellzyklus resultiert, was wiederum zur Aktivierung von p53 und dessen proapoptotischen Funktionen führt [humane Papillomviren: E7-Protein; Epstein-Barr-Virus: EBNA-3C-Protein; Adenoviren: E1A-Protein] [161];
- die Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und dessen stimulatorischer Signalwege [African Swine Fever Virus: 5EL-Protein] [71].

Weitere Mechanismen

Andere bisher beobachtete Strategien zur Stimulierung der Apoptose umfassen:

- die Induktion der Interferon-Synthese [Paramyxoviren, Influenza-A/B-Viren] [161];
- die Erhöhung von ROS in der Zelle [HIV-1: Tat-Protein] [71];
- die Schädigung der DNA durch Strangbrüche [humanes Parvovirus B19: NS-1-Protein] [161];
- die verstärkte Expression der Caspase-8 [HIV-1: Tat-Protein] [71].

Picornaviren und Apoptose

Hinsichtlich der Manipulierung des programmierten Zelltods gibt es, im Vergleich zu anderen Virusfamilien, für die Picornaviren bisher nur unvollständige Daten und die Verbindung zwischen Infektion sowie Induktion und Art des Zelltods ist nicht klar definiert.

Für CVB3 zeigten Carthy *et al.* 1998 erstmals, dass es im Verlauf einer Infektion von HeLa-Zellen zur Induktion der Apoptose kommt, indem die Prozessierung der Caspase-3 sowie deren enzymatische Aktivität nachgewiesen wurden [30]. Dabei wurde auch gezeigt, dass die Aktivierung von Caspasen nicht für das Auftreten des zytopathischen Effekts verantwortlich war, da dieses durch die Zugabe eines irreversiblen pan-Caspase-Inhibitors (z-VAD-fmk) nicht verhindert werden konnte und daher eher die Aktivität der viralen Proteasen die Ursache dieser Erscheinung ist. Auch bei der Infektion verschiedener

Zelllinien mit Polioviren wurde die Induktion des apoptotischen Zelltods beschrieben. Dabei wurden u. a. murine, primäre Nervenzellkulturen untersucht, in denen die Caspase-abhängige Fragmentierung der DNA nachweisbar war [41], ebenso wie in der promonozytischen Zelllinie U937 [113] oder in HeLa- und 293-Zellen [14, 67]. Das Poliovirus (Typ 1) war auch das erste Mitglied der Virusfamilie, für das Proteine mit Apoptose-induzierender Funktion identifiziert werden konnten. So führte die alleinige Expression der viralen Proteasen 3C bzw. 2A zum programmierten Zelltod, wobei in HeLa-Zellen unterschiedliche Zeitverläufe der Apoptose-Induktion beobachtet wurden, die qualitative und quantitative Unterschiede reflektierten. Während die Wirkung der 2A-Protease die Apoptose zwar schnell einleitete, kam es auch schnell zur Zerstörung der Membranintegrität, einem Zeichen der sekundären Nekrose. Dahingegen rief die Expression der 3C-Protease verzögert, aber deutlicher die Kennzeichen apoptotischer Prozesse hervor [14, 67, 27]. Der Nachweis der Apoptose-aktivierenden Fähigkeit der viralen Proteasen erfolgte auch für das Enterovirus 71 [108, 100], so dass anzunehmen ist, dass dies auch auf weitere Picornaviren übertragen werden kann.

Durch Experimente der Arbeitsgruppe von Vadim Agol wurden komplexere Aspekte der Apoptose-modulierenden Funktionen des Poliovirus aufgezeigt. Diese Versuche führten zur erstmaligen Beschreibung einer antiapoptotischen Aktivität eines RNA-Virus [199], da hier unter Bedingungen einer produktiven Virusinfektion nur typische Anzeichen des zytopathischen Effekts, nicht aber der Apoptose beobachtet werden konnten. Erst bei der Inhibierung der Virusreplikation wurden deutliche apoptotische Marker detektiert. Der antiapoptotische Zustand der produktiven Infektion, dessen Ursache unbekannt ist, ermöglichte sogar die Unterdrückung der durch Chemikalien induzierten Apoptose in HeLa-Zellen [199, 3]. Mit späteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass es im Infektionsverlauf eine Umstellung von einer anfänglich proapoptotischen auf die antiapoptotische virale Funktion gab und die Poliovirus-Infektion zur Ausprägung des ZPE führte [4].

Die Bedeutung der Apoptose im Verlauf von Picornavirus-Infektionen wurde, aufgrund des sehr kleinen RNA-Genoms (und der damit verbundenen geringen Kapazität zur Entwicklung Apoptose-beeinflussender Funktionen) und wegen der geringen Dauer des Replikationszykluses dieser Viren (der dadurch von apoptotischen Prozessen vielleicht weniger beeinflussbar wäre), erst in den letzten Jahren verstärkt berücksichtigt und untersucht [28].

Dabei sind nicht nur die zellulären Veränderungen während der aktiven Phase der Virusreplikation interessant, sondern auch das Schicksal der absterbenden Zelle, das die Pathogenese der viralen Erkrankung entscheidend beeinflussen kann. Eine eingehendere Untersuchung dieser Vorgänge ist für ein genaueres Verständnis der Pathogenese und die darauf basierende Entwicklung möglicher therapeutischer Verfahren von großer Bedeutung.

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Zellkultivierung

Für die Arbeiten wurden folgende Zelllinien verwendet:

- 293-Zellen: humane, embryonale Nierenzellen, transformiert mit Adenovirus Typ 5 DNA, adhärent, mit epithelialer Morphologie;
- GMK-Zellen: Nierenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze („green monkey kidney“), adhärent, mit epithelialer Morphologie;
- Jurkat-Zellen: humane T-Lymphozytenzelllinie, etabliert aus einer akuten T-Zell-Leukämie, Suspensionszellen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit. Für eine Passage der adhärennten Zellen wurden diese mittels Trypsin abgelöst, in Medium resuspendiert und nach Bedarf neu ausgesät. Die Suspensionszellen wurden durch das Verwerfen eines Teils der Kultur und Zugabe neuen Mediums passagiert. Eine Lagerung von Zellen über längere Zeiträume erfolgte in Form von Kryokulturen. Dafür wurde den resuspendierten Zellen 10% DMSO zugesetzt, um sie nach anfänglicher Lagerung bei -80 °C längerfristig bei -170 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahren zu können. Für die Weiterkultivierung einer Kryokultur wurde diese zügig aufgetaut, in Medium aufgenommen und für 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in Medium erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen im Brutschrank.

- Medium für 293- und GMK-Zellen: DMEM-Medium [„Dulbecco’s modified Eagle’s medium“ (Sigma-Aldrich, # D7777)] mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (Sigma, inaktiviert bei 56°C für 30 min); 0,075% NaHCO₃; 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin [CAMBREX: PEN-STREP (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)]
- Medium für Jurkat-Zellen: RPMI 1640-Medium [„Roswell Park Memorial Institute“ (BIOCHROM AG, # FG1215)] mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin
- Trypsinlösung: PBS (s. 3.1.2.) mit 0,4% Trypsin (zur Zellzucht geeignet), 0,1% Chelaplex III und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin

3.1.2. Trypanblau-Färbung und Fixierung

Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe der Trypanblaufärbung untersucht. Hierbei dringt der Farbstoff durch defekte Zellmembranen in das Zytoplasma ein und führt dort zu einer Blaufärbung der Proteine, lebende Zellen werden nicht angefärbt. Die Zellen wurden mit

Trypanblaulösung (Verhältnis 2:1) versetzt, für 5 min bei 37 °C inkubiert und lichtmikroskopisch untersucht.

Für eine Konservierung der Zellen und spätere mikroskopische Analyse wurden diese auf Deckgläschen kultiviert und fixiert. Dazu wurde das Medium entfernt und bei RT für 30 min Paraformaldehyd/PBS Lösung zugegeben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für 10 min wurden die Deckgläschen mit Eindeckmittel auf Objektträger gebracht und bei 4 °C aufbewahrt.

- Trypanblaulösung: 0,5% Trypanblau in NaCl (0,9%-ig)
- Paraformaldehyd/PBS Lösung: 4% Paraformaldehyd gelöst in PBS
- PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; pH 7,4
- Eindeckmittel: AQUATEX® (Merck)
- Lichtmikroskop: Carl Zeiss Jena: „TELAVAL3“
- Fluoreszenzmikroskop: Zeiss: „Axioskop 2 MOT“ mit 3 Fluoreszenzfiltern (Filter 1: 395 nm, Filter 2: 510 nm, Filter 3: 580 nm)
- Konfokales Laserscanningmikroskop: Carl Zeiss „LSM 510“ [Ar-Laser (458, 477, 488, 514 nm) 30 mW]

3.1.3. Transfektion

Für die Transfektion von 293-Zellen mit Plasmid-DNA wurde das „Effectene® Transfection Reagent“ (QIAGEN) verwendet. Hierbei wurde die kondensierte DNA in micellare Strukturen eingelagert, die von den Zellen aufgenommen werden konnten. Um eine hohe Transfektionsrate der Zellen zu erzielen, wurden Kulturen mit geringer Zelldichte (ca. 20% konfluent) angelegt und gemäß Protokoll transfiziert. Für die Zellen eines wells (6-well Zellkulturplatte) wurden 0,4 µg DNA mit Enhancer (3,2 µl) in EC-Puffer (100 µl) für 5 min bei RT kondensiert, mit 10 µl Effectene-Reagenz versetzt und erneut bei RT (10 min) inkubiert. Nach Bildung des DNA-Lipid-Komplexes wurde dieser (mit 0,6 ml Medium gemischt) auf die Zellen getropft und diese anschließend im Brutschrank kultiviert. Bei transienten Transfektionen erfolgte die Analyse der Zellen nach 1 bis 3 Tagen. Bei stabilen Transfektionen wurde nach 2 Tagen mit der Selektion der transfizierten Zellen begonnen, indem die Zellen mit Selektionsmedium versetzt wurden, was zum Absterben des größten Teils der Zellen innerhalb von 1 bis 2 Wochen führte und die Anzucht der transfizierten Zellen erlaubte.

Die Transfektion von *in vitro*-transkribierter RNA erfolgte in ähnlicher Weise unter Verwendung des „TransMessenger™ Transfection Reagent“ (QIAGEN) entsprechend den Herstellerangaben. Um 293-Zellen eines wells (12 well-Zellkulturplatte) zu transfizieren, wurden 1,6 µg RNA nach Zugabe von EC-R-Puffer und 3,2 µl Enhancer (Gesamtvolumen 100 µl) mit TransMessenger- Reagenz versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Zu diesem

Komplex wurden 300 µl serumfreies Medium gegeben und die 293-Zellen für 4 h mit dieser Mischung kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, 2 ml frisches serumhaltiges Medium zugegeben und die Zellen bis zu ihrer Analyse weiter kultiviert.

- „Effectene[®] Transfection Reagent“ (QIAGEN)
- Selektionsmedium: Medium mit Zusatz von Antibiotikum, je nach transfiziertem Vektor: Puromycin (5 µg/ml); Geneticin (200 µg/ml; =G418; =Neomycin)
- „TransMessenger[™] Transfection Reagent“ (QIAGEN)

3.1.4. Infektion

Je nach Versuchsansatz wurden Zellen in entsprechende Zellkulturplatten (bei Bedarf auf Deckgläschen) ausgesät und bis ca. 90% Konfluenz kultiviert. Zum Zeitpunkt der Infektion wurde die Zellzahl bestimmt und das Medium gewechselt. Für die Infektion der Zellen mit einer bestimmten „multiplicity of infection“ (moi; meist 2,5 oder 5) wurde das entsprechende Volumen der Viruslösung zugegeben, die das 2,5- bzw. 5-fache der Zellzahl an infektiösen Einheiten enthielt, was dem Zeitpunkt 0 h post infectionem (p. i.) entsprach. Je nach Versuchsaufbau erfolgte die Zugabe von Caspase-Inhibitoren zu den angegebenen Zeitpunkten. Die infizierten Zellen wurden im Brutschrank kultiviert und zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen. Die Probenentnahme richtete sich nach der geplanten Analyse. Für Virustiterbestimmungen wurden sowohl die Zellen, als auch der Kulturüberstand entnommen und bei -80 °C aufbewahrt. Bei getrennter Bestimmung von extra- und intrazellulärem Virustiter wurden die Zellen vom Überstand getrennt, das Pellet mit Medium gewaschen und in einem dem Kulturüberstand entsprechendem Volumen bei -80 °C aufbewahrt. Für Protein-, DNA- und RNA-Isolierungen wurde das Zellpellet (Zentrifugation für 4 min bei 6000 U/min) geerntet und bei -80 °C gelagert. Mikroskopische Analysen erfolgten entweder sofort zum Zeitpunkt der Probenentnahme mit frischen Zellen oder anhand fixierter Präparate zu einem späteren Zeitpunkt.

- Caspase-Inhibitoren:
 - z-VAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketon, R&D Systems, irreversibler, zellpermeabler pan-Caspase-Inhibitor, gelöst in DMSO, Endkonzentration 50 µM)
 - q-VD-o-Ph (quinoline-Val-Asp-(non-Omethylated)-CH₂-difluorophenoxy, MP Biomedicals, irreversibler, zellpermeabler pan-Caspase Inhibitor, gelöst in DMSO, Endkonzentration 50 µM bzw. 200 µM)

3.2. Virologische Methoden

Es wurden cDNA-generierte Coxsackieviren B3 des Stammes „Nancy“ verwendet:

- CVB3H3 (Variante Woodruff [204, 97])
- CVB3H310A1 (Mutante von CVB3H3 [97])
- CVB3H3/EGFP (Variante Woodruff/ Kandolf [181]).

3.2.1. Virusvermehrung

Für die Vermehrung der Viren wurden konfluente GMK-Zellen infiziert. Dabei erfolgte die Adhäsion der Viren in einem kleinen Volumen für 45 min im Brutschrank unter regelmäßigem Schwenken. Anschließend wurde frisches Medium zugegeben und die Zellen bis zur deutlichen Ausbildung eines zytopathischen Effekts (ZPE) weiterkultiviert. Für eine Ernte der Viren aus den Zellen wurden die Kulturflaschen dreimal bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut. Nach Zentrifugation (10 min, 5000 U/min) wurde der virushaltige Überstand portioniert und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.2. Viruskonzentrationsbestimmung

Plaque-Test:

(quantitative Bestimmung der Anzahl infektiöser Einheiten pro Volumeneinheit)

Für diesen Test wurden konfluente GMK-Zellkulturen (6-well Zellkulturplatten) mit einem bestimmten Volumen (333 µl) verschiedener Verdünnungsstufen (1:10) der Viruslösung infiziert. Nach Adhäsion der Viren (45 min im Brutschrank unter regelmäßigem Schwenken) wurde die Viruslösung abgenommen und die Zellen mit Agar-haltigem Medium (Overlay) überschichtet, um die vertikale Ausbreitung der Viren zu verhindern. Die Zellen wurden bis zur Ausbildung von Lysehöfen (Plaques) im Brutschrank inkubiert (in der Regel 3 Tage). Durch die Anfärbung der lebenden Zellen mit Kristallviolett-Formaldehyd und die Entfernung des Overlays ist ein Auszählen der (nichtgefärbten) Plaques möglich. Die Viruskonzentration ergibt sich aus der Anzahl der Plaques je well und wird bezogen auf das Volumen (333 µl) und die Verdünnungsstufe als infektiöse Einheiten (plaque forming units) je ml errechnet [pfu/ml].

TCID₅₀-Test:

[tissue culture infectious dose; quantitative Endpunkttitration nach Reed und Muench (1938) [154] mit Angabe des TCID₅₀-Wertes, der die errechnete Verdünnung angibt, in welcher im Durchschnitt noch eine infektiöse Einheit pro eingesetztem Volumen vorhanden ist]

In 96-well Zellkulturplatten wurden je well 100 µl einer GMK-Zellsuspension (2×10^5 Zellen/ml) pipettiert und für 2 h im Brutschrank inkubiert. Das Auftragen der Virusverdünnungen

(10-fach) auf die Zellen erfolgte in 4 Parallelen à 50 µl/well. Nach vier- bis fünftägiger Inkubation der Zellen wurden diese mikroskopisch auf das Vorhandensein eines ZPE untersucht und die Konzentration nach Reed und Muench errechnet.

- Overlay für Plaque-Test: doppelt konzentriertes MEM („Minimal Essential Medium Eagle“, Sigma # M0643; 47,95 g gelöst in 2,5 l destilliertem Wasser; sterilfiltriert) mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin, sowie 0,5% Agar („Purified Agar“, DIFCO LABORATORIES; Stammlösung: 1% in sterilem, destilliertem Wasser), temperiert auf 42 °C
- Kristallviolett-Formaldehyd-Lösung für Plaque-Test: 0,2% Kristallviolett; 3,5% Formaldehyd; 20% Ethanol

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Bakterienkulturen

Für die Arbeiten wurden folgende *Escherichia coli*- Stämme verwendet:

Stamm	Genotyp	Verwendungszweck
▪ TG1	<i>hsd5 F traD36 proA⁺B⁺ (Δlac- pro)</i> <i>lacQ lacZΔM15</i>	Plasmidklonierung
▪ BL21 (DE3)	<i>F ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	3C ^{pro} -Expression PABP-Expression
▪ M15 [pREP4]	<i>nalS strS rifS lac ara gal mtl F lacI</i> Km ^r	VP2-Expression

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte standardgemäß mit LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotikazusätzen) bei 37 °C im Brutschrank (auf LB-Agarplatten) oder bei 37 °C auf einem Schüttler bei 200-240 U/min (LB-Flüssigmedium). Das Wachstum der Kulturen wurde (wenn erforderlich) anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) verfolgt (SHIMADZU Spectrophotometer UV-160A). Für die Konservierung der Bakterienstämme wurden Kryokulturen angelegt, indem entsprechende Submerskulturen mit 10% Glycerol versetzt und bei -80 °C aufbewahrt wurden.

- LB-Agarplatten: für 500 ml: 12,5 g „LB broth, Miller“ (Sigma); 5 g Agar (Agar Agar SERVA Kobe I, SERVA), Lösung autoklavieren, abkühlen und Antibiotikum zugeben
- LB-Flüssigmedium: für 500 ml: 12,5 g „LB broth, Miller“ (Sigma), Lösung autoklavieren
- Antibiotika: Ampicillin (Stammlsg.: 100 mg/ml *a. dest.*; Endkonzentration: 100 µg/ml), Kanamycin (Stammlsg.: 10 mg/ml *a. dest.*; Endkonzentration: 25 µg/ml)

3.3.2. Transformation von *E. coli* nach der CaCl₂-Methode

Präparation kompetenter Zellen:

Eine Übernachtskultur (4 ml) wurde in frisches Medium (400 ml) umgesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und die Zellen pelletiert (4 °C, 10 min, 4000 U/min). Nach Resuspension des Pellets in 20 ml CaCl₂-Lösung (0 °C), fünfminütiger Inkubationszeit auf Eis und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 4 ml CaCl₂-Lösung (0 °C) aufgenommen, 450 µl Glycerol zugegeben und in 100 µl Aliquots bei -80 °C aufbewahrt.

- CaCl₂-Lösung: 0,1 M CaCl₂, steril filtriert

Transformation kompetenter Zellen:

100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA bzw. dem gesamten Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock (2 min, 42 °C) ausgesetzt, mit 0,9 ml LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C kultiviert. Daraufhin erfolgte die Selektion auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika über Nacht im Brutschrank (Ausplattieren von 100 µl des Transformationsansatzes bei Verwendung von Plasmid-DNA bzw. aller Zellen bei Transformation eines Ligationsansatzes).

3.3.3. Bakterielle Proteinexpression und -reinigung

Für die Expression von rekombinanten Proteinen wurden über Nacht angezogene Submerskulturen (Zusatz von 1,5% Glukose zum Medium zur Unterdrückung der Genexpression) auf eine OD₆₀₀ von 0,1 in neues Medium (400 ml, Zusatz von 0,5% Glukose) überimpft. Die Induktion der Genexpression erfolgte mit 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) bei einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,9 für 4 h. Das Zellpellet (Zentrifugation für 30 min, 10.000 U/min, 4 °C) wurde bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Die verwendeten Vektoren zur Genexpression kodierten für einen 6xHis-tag, so dass die rekombinanten Fusionsproteine mittels Ni-NTA-Agarose (QIAGEN) laut Herstellerangaben (QIAexpressionist™) aufgereinigt werden konnten. Die Art der Reinigung, denaturierend bzw. nativ, richtete sich nach der weiteren Verwendung der rekombinanten Proteine. Für die Generierung von Kaninchen-Antiserum gegen das VP2-Protein von CVB3 erfolgte die Reinigung denaturierend, während die 3C-Protease zur Erhaltung ihrer Aktivität, sowie das Substratprotein PABP nativ aufgearbeitet wurden. Im Anschluss an die Reinigung wurden die proteinhaltigen Eluate über Nacht bei 4 °C dialysiert (His₆-VP2 gegen PBS, 3C-His₆ und His₆-PABP gegen Protease-Puffer) und bei -20 °C (His₆-VP2) bzw. bei 4 °C (3C-His₆ und His₆-PABP) gelagert.

- verwendete Expressionsvektoren:
 - pQE9-VP2: Expression von VP2 mit N-terminalem His₆-tag in *E. coli* M15 [pREP4]
 - pET23a-3C: Expression von 3C mit C-terminalem His₆-tag in *E. coli* BL21 (DE3)
 - pET28a-PABP: Expression von PABP mit N-terminalem His₆-tag in *E. coli* BL21(DE3)
- Protease-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 5% Glycerol
- PBS: s. 3.1.2.

3.3.4. Proteinisolation und Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Gewinnung von eukaryotischen Zellextrakten wurden die Pellets in NTE-Puffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 0,5% NP-40 und vortexen für 30 s. Nach Zentrifugation (20 min, 4 °C, 14000 U/min) wurde der Proteingehalt des Überstandes bestimmt und dieser bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurden in einer 96-well Zellkulturplatte in Parallelansätzen 100 µl der verdünnten Proteinlösung mit 100 µl Bio-Rad-Farbstoff versetzt und die OD₅₇₀ gemessen („Mikroplate Reader Dynatech MR5000“). Die Proteinkonzentration wurde mittels Eichgerade ermittelt, die in Parallelansätzen mit 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 und 15 µg/ml „bovine serum albumin“ (BSA) hergestellt wurde.

- NTE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl
- NP-40 („nonionic detergent-P40“, Sigma): 10%-ige Stammlösung
- Bio-Rad-Farbstoff: Bio-Rad-Farbstoffkonzentrat 1:5 verdünnt und filtriert
- BSA: Stammlösung 1,4 mg/ml in Aliquots bei -20 °C

3.3.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für eine geeignete Auftrennung der Proteine gemäß ihrer molaren Massen wurden entsprechende Trenngele (7,5%; 10%; 12,5% bzw. 15% Polyacrylamid), sowie 5%-ige Sammelgele hergestellt und die „Mini-PROTEAN“-Gelapparatur (Bio-Rad) verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen durch Zugabe des Probenpuffers und dreiminütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert. Die aufgetragene Proteinmenge war abhängig von der Proteinkonzentration der Proben und betrug in der Regel 40 µg. Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung (bei 100V-120V) erfolgte die Anfärbung der Gele mit Coomassie Brilliant Blue R250® für mindestens 2 h und eine anschließende Entfärbung des Hintergrundes.

- zur Herstellung des Sammelgels (1,6 ml): 5% Acrylamidlösung (30% Acrylamid; 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid), Sammelgelpuffer (4x: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% SDS), 18 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat), 2 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin)

- zur Herstellung des Trenngels (4,8 ml): 7,5%-15% Acrylamidlösung (30% Acrylamid; 0,8% Methylenbisacrylamid), Trenngelpuffer (4x: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4% SDS), 21 µl APS, 5 µl TEMED
- Probenpuffer (2x): 100 mM Tris/HCl pH 6,0; 4% SDS; 10% β-Mercaptoethanol; 20% Glycerol; 0,1% Bromphenolblau
- Elektrophoreselaufpuffer (10x): 250 mM Tris/HCl pH 8,3; 1,92 M Glycin; 1% SDS
- Coomassie-Färbelösung: 0,1% „Coomassie Brilliant Blue R250®“; 40% Methanol; 7% Essigsäure
- Coomassie-Entfärbelösung: 5% Methanol; 7% Essigsäure
- Molekulargewichtsmarker: 5 µl/Spur (Fermentas: „Page Ruler™ Prestained Protein Ladder“)

3.3.6. Western Blot

Für die Detektion spezifischer Proteine mittels Western Blot wurden diese nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE bei konstanter Spannung (12 V, über Nacht, unter Kühlung) auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell PROTRAN®: BA85, Porengröße 0,45 µm) geblottet. Freie Bindungsstellen der Membran wurden durch einstündige Inkubation in TBST-Puffer mit 3% Magermilch (MM) blockiert. Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte in entsprechender Verdünnung in einem TBST-Puffer mit 1% MM für 1 h bis 2 h bei RT. Nach dreimaliger Wäsche für 10 min mit TBST-Puffer wurde ein sekundärer Alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper in TBST-Puffer/1% MM zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei RT und dreimaliger Wäsche (10 min TBST) wurde der Blot gefärbt. Dazu wurde er für 5 min bis zu 2 h, je nach Intensität der Reaktion, in Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Spülen der Membran mit Wasser beendet und der Blot auf Filterpapier getrocknet.

- TBST-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20
- Färbelösung (ausreichend für 2 Blots): 1 Tablette NBT/BCIP ready-to-use (Roche) aufgelöst in 15 ml Wasser
- primäre Antikörper:
 - Rabbit-Anti-VP2(CVB3) Antiserum: ungereinigt [gewonnen von Dr. A. Härtl (Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology - Hans-Knöll-Institute; Department of Microbial Pathogenicity Mechanisms) durch Applikation von Ni-NTA-Agarose-gereinigtem His₆-VP2(CVB3)], 1:100
 - Rabbit-Anti-Siva Antiserum: ungereinigt (gewonnen von Dr. A. Härtl durch Applikation von Amylose-gereinigtem MBP-Siva), 1: 200
 - Goat-Anti-Siva: Santa Cruz Biotechnology (# sc-7250), polyklonal, 0,2 mg/ml; 1:100
 - Mouse-Anti-Cyt C: BD PharMingen (# 556433), monoklonal, 0,5 mg/ml; 1:2500

- Rabbit-Anti-Casp-3: Santa Cruz Biotech. (#sc-7148), polyklonal, 0,2 mg/ml; 1:300
- Rabbit-Anti-PARP: Santa Cruz Biotech. (# sc-7150), polyklonal, 0,2 mg/ml; 1:300
- Rabbit-Anti-Casp-9: R&D Systems (# MAB8301), monoklonal, 1 mg/ml; 1:500
- Mouse-Anti-Casp-8: R&D Systems (# AF1650), polyklonal, 1 mg/ml; 1:800
- Mouse-Anti-GFP: BOEHRINGER MANNHEIM (# 1814460), monoklonal, 0,4 mg/ml; 1:450
- Rabbit-Anti-Active-Casp-3: EPITOMICS® (# 1476-1), monoklonal, 1:500
- sekundäre Antikörper:
 - Swine-Anti-Rabbit-AP: DakoCytomation (# D0306), polyklonal, 0,36 mg/ml; 1:1000
 - Rabbit-Anti-Mouse-AP: DPC BIERMANN (# R1253AP), polyklonal, 0,7 mg/ml; 1:2000
 - Mouse-Anti-Goat-Biotin-SP: Jackson ImmunoResearch Laboratories (# 205-065-108), 0,77 mg/ml; 1:4000; Entwicklung mittels „Peroxidase Substrate Kit DAB“ (Vector Laboratories, Inc., # SK4100)

3.3.7. Aktivitätstest der viralen Proteasen 3C und 2A *in vitro*

Für den Nachweis der Aktivität der gereinigten Proteine 3C und 2A (bereitgestellt von Dr. J. Seipelt, Max. F. Perutz Laboratories, University Departments at the Vienna Biocenter, Department of Medical Biochemistry, Medical University Vienna) wurden diese mit dem gereinigten Substratprotein PABP im Verhältnis 1:1, in Protease-Puffer und unter Zugabe von Caspase-Inhibitoren (in verschiedenen Konzentrationen) über Nacht bei RT inkubiert und der gesamte Ansatz für die SDS-PAGE verwendet.

- Protease-Puffer: s. 3.3.3.
- Caspase-Inhibitoren: s. 3.1.4.

3.4. Molekulargenetische Methoden

3.4.1. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Mini-Präparation:

Für die Suche nach gewünschten Transformanten wurden Zellpellets (7000 U/min, 1 min) von Übernachtskulturen (2 ml) in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung 2, vorsichtiges Homogenisieren und Inkubation bei RT für 5 min. Die Zugabe von 150 µl Lösung 3, intensives Mischen und Inkubation von 5 min auf Eis führte zur Denaturierung und Aggregation hochmolekularer Substanzen, während die Plasmid-DNA in Lösung verblieb. Durch Zentrifugation (14000 U/min, 10 min) wurde das Lysat geklärt und durch Zugabe von 2 Vol. (900 µl) Ethanol (96%) und Zentrifugation (14000 U/min, 20 min,

4 °C) die Plasmid-DNA gefällt. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer (in der Regel 40 µl) resuspendiert.

Midi-Präparation:

Für die präparative Aufreinigung von Plasmid-DNA für Klonierungs- oder Transformationsarbeiten wurde der „QIAfilter™ Plasmid Midi Kit“ (QIAGEN) gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet.

- Lösung 1: 10 mM Tris/HCl pH 8,1; 10 mM EDTA; 50 mM NaCl; 20% Saccharose; 100 µg/ml RNaseA
- Lösung 2: 0,2 M NaOH; 1% SDS
- Lösung 3: 3 M Na-Acetat pH 5,2
- TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA

3.4.2. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Gele:

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 1%-ige bis 2%-ige Agarose-Gele (in 0,5x TBE-Puffer) hergestellt, denen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben wurde. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, bei 100-120 V in 0,5x TBE-Puffer aufgetrennt und die Gele mit dem Herolab (E.A.S.Y. RH-3) fotografiert.

- TBE-Puffer (0,5x): 45 mM Tris/HCl pH 8,0; 45 mM Borsäure; 1,5 mM EDTA
- Probenpuffer (6x): 30% Glycerol; 10 mM EDTA; 0,05% Bromphenolblau
- Größenmarker: 5 µl/ Spur „HyperLadder I“ (BIOLINE)

RNA-Gele:

Die Qualität isolierter RNA wurde mit Hilfe von 1,5%-igen Agarosegelen (in 10 mM Na-Phosphatpuffer, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) überprüft und anhand der Schärfe und Intensität der 28S- und 18S-rRNA-Banden beurteilt.

- Na-Phosphatpuffer (10 mM): 0,1 M Na₂HPO₄ und 0,1 M NaH₂PO₄ im Verhältnis 1:1 mischen und Gemisch 1:10 verdünnen

3.4.3. Quantifizierung von DNA und RNA

Eine Quantifizierung von DNA bzw. RNA war zum einen durch die Agarose-Gelelektrophorese und dem Vergleich mit dem Größenmarker möglich. Für einige Experimente (z. B. Transfektionen, Reverse Transkriptionen) erfolgte die Konzentrationsbestimmung photometrisch bei 260 nm nach der Formel:

$$\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50/1000$$

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40/1000.$$

3.4.4. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA wurde der „Thermocycler“ von MJ Research (PTC-200) verwendet. Die Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

„template“ DNA:	0,3- 2 µl
10x <i>Taq</i> -Puffer:	5 µl
25 mM MgCl ₂ :	5 µl
10 mM dNTP's:	1,5 µl
Primer (5', 3'):	je 1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase:	0,5 µl
(Promega)	
dest. Wasser:	34- 35,7 µl

[Die lyophilisierten Primer wurden in destilliertem, sterilem Wasser resuspendiert (je OD₂₆₀ = 20 µl).]

Die PCR-Bedingungen (Annealing, Extension) wurden je nach der Sequenz der Primer, sowie der Länge der zu amplifizierenden DNA modifiziert:

5 min 95 °C//30 Zyklen: 50 s 95 °C/50 s 56 °C/50 s 72 °C//5 min 72 °C.

Eine Analyse der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch und für die Aufreinigung wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN) den Herstellerangaben gemäß eingesetzt.

3.4.5. Real-time PCR

Für die Quantifizierung von cDNA mit Hilfe der real-time PCR wurde der LightCycler® der Firma Roche, sowie das „QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit“ (QIAGEN) verwendet. Hierbei wurde durch die Bindung des Farbstoffs SYBR Green I an doppelsträngige DNA ein Fluoreszenzsignal abgegeben und detektiert. Die Auswertung der PCR (LightCycler3 Run, Version 5.32) erfolgte unter Verwendung der zugehörigen Software (Version 3.5). Es wurden je Probe 10 µl des 2x „QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix“; 8 µl DEPC-H₂O; je 0,5 µl 5'- bzw. 3'-Primer und 1 µl RT-Produkt gemischt und in die PCR-Kapillaren pipettiert. Die PCR- Programme wurden wie folgt durchgeführt:

Aktivierung der HotStar *Taq* Pol.//Denaturierung/Anlagerung der Primer/Synthese/Abschmelzen von Primer-Dimeren.

- Amplifikation eines 119 bp-Fragments (nt 3305-nt 3424) spezifisch für die 2A-Protease:
15 min 95 °C//30 Zyklen: 15 s 94 °C/20 s 61 °C/20 s 72 °C/5 s 77 °C
- Amplifikation eines 192 bp-Fragments (nt 5441-nt 5632) spezifisch für die 3C-Protease:
15 min 95 °C//32 Zyklen: 15 s 94 °C/20 s 58 °C/25 s 72 °C/5 s 81 °C

Die Quantifizierung der eingesetzten cDNA erfolgte durch Vergleich mit der jeweiligen, zuvor etablierten Standardkurve unter Verwendung von standardisierten, linearisierten Plasmiden

(von 10^1 bis 10^8 Kopien/ μ l) des Plasmids pBK-CVB3H3 (XhoI). In jedem Lauf wurde zur internen Kontrolle dieses Plasmid mitgeführt.

3.4.6. Restriktion von Plasmiden und DNA-Fragmenten

Für die hydrolytische Spaltung von DNA kamen Restriktionsenzyme und entsprechende Puffer (10x) der Firmen AGS GmbH, Roche und NEB zum Einsatz. Der Restriktionsansatz aus DNA, Enzym, Puffer und destilliertem Wasser wurde bei 37 °C inkubiert, bei analytischen Restriktionen 1 h, bei präparativen Ansätzen 3 h oder über Nacht. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde anhand der Agarose-Gelelektrophorese (3.3.2.) überprüft. Wenn erforderlich, erfolgte die Isolierung eines spezifischen Spaltproduktes aus dem Agarose-Gel mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) gemäß dem Herstellerprotokoll.

3.4.7. DNA-Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde, bei Verwendung nur eines Restriktionsenzym, eine Dephosphorylierung des Vektors vorgenommen, um eine Religation zu verhindern. Dazu wurde in einem 100 μ l Ansatz die gereinigte Vektor-DNA, 1 μ l „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (Promega) und 10 μ l Puffer (10x) für 15 min bei 37 °C und anschließend für 15 min bei 65 °C inkubiert. Die dephosphorylierte DNA wurde mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN) aufgereinigt. Um die in die Ligation („sticky ends“) einzusetzenden Mengen von Vektor- und Insert-DNA abzuschätzen, wurden ihre Konzentrationen durch Vergleich mit dem DNA-Marker quantifiziert. Nach der Formel: $\text{Insert (ng)} = 3 \times \text{Vektor (ng)} \times \text{Insert (bp)} / \text{Vektor (bp)}$ wurden die benötigten Mengen von Vektor und Insert bestimmt und mit 1 μ l T4-DNA-Ligase (Roche) und Puffer (10x) 2 h bei RT inkubiert. Bei „blunt end“- Ligationen wurde mit einem Insert:Vektor-Verhältnis von 5:1 über Nacht bei 16 °C ligiert. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte gemäß 3.3.2.

3.4.8. DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA-Proben wurde eine modifizierte Form („Cycle Sequencing“) der Kettenabbruchmethode verwendet, wobei die Fragmente durch Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und die verschiedenen fluoreszierenden Didesoxyribonucleotide mittels Laserdetektion im Sequenziergerät (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer) identifiziert wurden. Der Sequenzierungsansatz (Gesamtvolumen 10 μ l) wurde wie folgt pipettiert:

„template“ DNA:	1-5 μ l	
Sequenziermix:	2 μ l	(„DYEnamic™ ET terminator kit“ von Amersham Biosciences)
Primer:	1 μ l	

Die Sequenzierreaktion bestand aus 25 Zyklen mit 20 s 95 °C/15 s 50 °C/1 min 60 °C. Die DNA des Sequenzieransatzes wurde anschließend durch Zugabe von 10 µl H₂O, 2 µl Na-Acetat (1,5 M; pH>8)/EDTA (250 mM)-Puffer, 80 µl Ethanol (100%) und Zentrifugation (12000 U/min, 15 min) gefällt. Nach dem Waschen (mit 70%-igem Ethanol) und Trocknen der DNA wurde diese in 20 µl „Template-Suppression-Reagent“ (ABI PRISM) resuspendiert und auf das Sequenziergerät aufgetragen.

3.4.9. RNA-Isolation aus Zellkulturen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden die zu untersuchenden Zellen pelletiert und mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (QIAGEN) gemäß dem Herstellerprotokoll aufgearbeitet.

3.4.10. Reverse Transkription (RT) der Gesamt-mRNA

Die RNA wurde mit Hilfe retroviraler Reverser Transkriptase („SuperScript™ II RNase H-Reverse Transcriptase“; Invitrogen) in DNA umgeschrieben. Dafür wurde ein oligo-d(T)-Primer verwendet, so dass alle mRNA-Spezies der Zelle und die virale RNA aufgrund ihrer poly-A-Sequenzen am 3'-Ende umgeschrieben wurden. Für die Reaktion wurden 5 µg RNA (mit DEPC-H₂O aufgefüllt auf 10 µl) und 1 µl oligo-d(T)-Primer (0,5 µg/µl) für 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach 3 min auf Eis erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien:

5x FSB (First Strand Buffer):	4 µl
10 mM dNTP's:	2 µl
0,1 M DTT:	2 µl
Reverse Transkriptase:	0,5 µl

Die RT-Reaktion fand durch Inkubation für 10 min bei 25 °C; 50 min bei 42 °C und 5 min bei 95 °C statt.

Für den Nachweis einer spezifischen Genexpression wurden im Anschluss an die RT 2 µl des RT-Reaktionsansatzes in die entsprechende PCR eingesetzt.

- DEPC-H₂O: 1 ml DEPC auf 1 l destilliertes Wasser, 24 h bei RT rühren, 2x autoklavieren

3.4.11. *In vitro*-Transkription

Um DNA in RNA umzuschreiben, wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen nicht in Transkriptionsvektoren subkloniert, sondern geeignete „templates“ mittels PCR generiert. Die 5'-Primer enthielten dafür vor der Gen-spezifischen Region die Promoter-Sequenz der T3-RNA-Polymerase (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGGxxxx_n-3', x: Gen-spezifische Nucleotide, n=23-28) und der 3'-Primer kodierte nach dem Gen-spezifischen Bereich für eine poly-A-Region durch das Anfügen von 30 Adenosin-Resten (5'-A₃₀-xxxxx_n-3', x: Gen-spezifische Nucleotide, n=22-26). Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des „QIAquick

PCR Purification Kit“ (QIAGEN) und 1 µg des gereinigten „template“ wurde in die *in vitro*-Transkriptionsreaktion eingesetzt. Zur Anwendung kam dabei das „Riboprobe® in vitro Transcription System – T3“ (Promega) und das „Ribo m⁷G Cap Analog“, so dass die RNA während ihrer Synthese mit einem 5'-Cap (7-Methylguanosin-Rest) versehen werden kann. Um die Menge an RNA-Produkt zu erhöhen, wurden 100 µl Ansätze verwendet, wobei nach einer ersten Inkubationsphase (1 h bei 37 °C) erneut T3-RNA-Polymerase (40U) zugegeben und eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend erfolgte der Verdau des DNA-„template“ durch die Zugabe von DNase I (1U/µg) und Inkubation bei 37 °C für 15 min. Die synthetisierte RNA wurde mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (QIAGEN, „RNA Clean up Protocol“) aufgereinigt und die Konzentration durch die Bestimmung des OD₂₆₀-Werts ermittelt (s. 3.4.3.). Für die Transfektion von 293 Zellen wurden 1,6 µg RNA (je 12 well) eingesetzt (s. 3.1.3.).

3.4.12. Plasmide und Primer

Tab. 1: Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
pBI	induzierbarer Expressionsvektor mit bidirektionalem Promoter P _{bi} für Säugerzellen, Amp ^r ,	Clontech
pBI-EGFP _C	pBI-Derivat, das in der MCS II bereits die EGFP-kodierende Sequenz enthält	Clontech
pEGFP-C1	konstitutiv exprimierender Vektor für Säugerzellen, der unter Kontrolle des P _{CMV} IE die Expression von EGFP erlaubt bzw. C-terminale Fusionen ermöglicht, Neo ^r	Clontech
pDsRed2-C1	konstitutiv exprimierender Vektor für Säugerzellen, der unter Kontrolle des P _{CMV} IE die Transkription von DsRed2 ermöglicht bzw. C-terminale Fusionen erlaubt, Neo ^r	Clontech
pQE-9	induzierbarer Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , der unter Kontrolle des T5-Promoters die Transkription von Sequenzen mit 5'-terminalem 6xHis-tag ermöglicht, Amp ^r	QIAGEN
pcDNA3-Siva	pcDNA3-Derivat (Invitrogen) für die konstitutive Expression von Siva (mit HA-tag) in Säugerzellen unter P _{CMV} -Kontrolle, Neo ^r	M. Nestler, HKI Jena
pIRESpuro2-VP2	pIRESpuro2-Derivat (Clontech) zur konstitutiven Expression (P _{CMV}) einer bicistronischen mRNA die für VP2 (CVB3H3) und die Puromycin-Resistenz kodiert	A. Henke, Inst. für Virologie & Antivirale Therapie, Jena
pET23a-3C	pET-23a-Derivat (Novagen) zur Expression der 3C-His ₆ -kodierenden Sequenz in <i>E. coli</i> unter Kontrolle des T7-Promoters, Amp ^r	R. Zell, Inst. für Virologie & Antivirale Therapie, Jena

Tab. 1 (Fortsetzung): Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
pET28a-PABP	pET-28a-Derivat (Novagen) zur Expression der His ₆ -PABP-kodierenden Sequenz in <i>E. coli</i> unter Kontrolle des T7-Promoters, Km ^r	R. Zell, Inst. für Virologie & Antivirale Therapie, Jena
pBI-EGFP-Siva	pBI-Derivat, das in der MCS I für EGFP kodiert, in der MCS II für Siva	A. Henke, Inst. für Virologie & Antivirale Therapie, Jena
pBI-EGFP-VP2	pBI-Derivat, das in der MCS I für EGFP kodiert, in der MCS II für VP2 von CVB3H3	A. Henke, Inst. für Virologie & Antivirale Therapie, Jena
pBI-Siva-EGFP	pBI-Derivat, das in der MCS I für Siva kodiert, in der MCS II für EGFP	diese Arbeit
pBI-VP2-EGFP	pBI-Derivat, das in der MCS I für VP2 (CVB3H3) kodiert, in der MCS II für EGFP	diese Arbeit
pBI-VP2-EGFP _C	pBI-EGFP _C -Derivat, das in der MCS I für VP2 (CVB3H3) kodiert	diese Arbeit
pBI-Siva	pBI-Derivat, das in der MCS I für Siva kodiert	diese Arbeit
pBI-VP2	pBI-Derivat, das in der MCS I für VP2 (CVB3H3) kodiert	diese Arbeit
pEGFP-Siva	pEGFP-C1-Derivat zur Expression der EGFP/Siva-Fusionssequenz	diese Arbeit
pEGFP-VP2	pEGFP-C1-Derivat zur Expression der EGFP/VP2-Fusionssequenz (CVB3H3)	diese Arbeit
pEGFP-VP2H310A1	pEGFP-C1-Derivat zur Expression der EGFP/VP2H310A1-Fusionssequenz (CVB3H310A1)	diese Arbeit
pDsRedStar-Siva	pDsRed2-C1-Derivat zur Expression der DsRedStar/Siva-Fusionssequenz nach Austausch der DsRed- gegen die DsRedStar-kodierenden Sequenz	diese Arbeit
pQE-9-VP2	pQE-9-Derivat, Expression der His ₆ -VP2 (CVB3H3)-kodierenden Sequenz	diese Arbeit

Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Phosphoamid-Methode mit dem Expetide Nr. 8909 (Firma PerSeptive Biosystems) von Dr. E. Birch-Hirschfeld (Institut für Virologie und Antivirale Therapie, FSU Jena) synthetisiert.

In den Oligonukleotiden sind die Sequenzen der Restriktionsenzym-Schnittstellen oder des T3-Polymerase-Promoters bzw. Poly-A-Schwanzes kursiv und unterstrichen und der Start- bzw. Stopcodons sowie der Nukleotide zum Erhalt des Leserahmens in den Fusionssequenzen **fett** dargestellt.

Tab. 2: Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
5'-VP2	5'-AATTAC <u>GCTAGC</u> ATG TCCCCACAGTAGAGG-3'	Klonierung von <i>VP2</i> in pBI (MCS I) (<i>NheI</i>)
3'-VP2	5'-ATCGTAGATATCTTACTGGTGCCCGGCCAA-3'	Klonierung von <i>VP2</i> in pBI (MCS I) (<i>EcoRV</i>)
5'-EGFP	5'-TAATATATT <u>GCGGCCGC</u> ATG GTGAGCAAGGGCGAGG-3'	Klonierung von <i>EGFP</i> in pBI (MCS II) (<i>NotI</i>)
3'-EGFP	5'-TAATATATT <u>GCGGCCGC</u> TTA CTTGTACAGCTCGTCC-3'	Klonierung von <i>EGFP</i> in pBI (MCS II) (<i>NotI</i>)
5'-Siva	5'-AATAAT <u>GCTAGC</u> ATG AGGCGGCCGGGAGCTGCGT-3'	Klonierung von <i>Siva</i> in pBI (MCS I) (<i>NheI</i>)
3'-Siva	5'-GCCGCCCCGGGATATCTTAGGTCTCGAACATGGCAC-3'	Klonierung von <i>Siva</i> in pBI (MCS I) (<i>EcoRV</i>)
N5/VP2	5'-AATTAC <u>GCTAGC</u> ATG TCCCCACAGTAGAGG-3'	Klonierung von <i>VP2</i> in pBI-EGFP _C (MCS I) (<i>NheI</i>)
N3/VP2	5'-ATTATTC <u>GCTAGC</u> TTA CTGGTGCCCGGCCAA-3'	Klonierung von <i>VP2</i> in pBI-EGFP _C (MCS I) (<i>NheI</i>)
5'Seq-pBI	5'-GAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGTCAG-3'	Sequenzierung von Inserts in pBI (MCS I)
3'Seq-pBI	5'-TCACCCTGAAGTTCTCAGTCT-3'	Sequenzierung von Inserts in pBI (MCS I)
QE-VP2 5'	5'-AATGATCTGCAG ATG TCCCCACAGTAGAGG-3'	Klonierung von <i>VP2</i> in pQE-9 (<i>PstI</i>)
QE-VP2 3'	5'-AACGTAAAGCTTTACTGGTGCCCGGCCAA-3'	Klonierung von <i>VP2</i> in pQE-9 (<i>HindIII</i>)
QE9-Seq 5'	5'-GGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTC-3'	Sequenzierung von Inserts in pQE-9
QE9-Seq 3'	5'-CTCGCCAAGCTAGCTTGGATTCTCACCA-3'	Sequenzierung von Inserts in pQE-9
Fus-Siva 5'	5'-TTCAAGAATTCTAGGCGGCCGGGAGCTGCGT-3'	Klonierung von <i>Siva</i> in pEGFP-C1 u. pDsRed2-C1 (<i>EcoRI</i>)
Fus-Siva 3'	5'-CGCGAATTCTTAGGTCTCGAACATGGCAC-3'	Klonierung von <i>Siva</i> in pEGFP-C1 (<i>EcoRI</i>)
Seq-Fus-Siva	5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'	Sequenzierung von Inserts in pEGFP-C1
3' Red-Siva	5'-CGCGTCGACTTAGGTCTCGAACATGGCAC-3'	Klonierung von <i>Siva</i> in pDsRed2-C1 (<i>SalI</i>)
Seq-Red	5'-GAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCTACT-3'	Sequenzierung von Inserts in pDsRed2-C1
RedStar-5'	5'-AACATAGCTAGCGCTACCGGTGCCACCAT GAGT -AGATCTTCTAAGAACGTC-3'	Klonierung von <i>RedStar</i> in pDsRed2-C1 (<i>NheI</i>)
RedStar-3'	5'-GGACGTCTCGAGATCT CAAGA ACAAGTGGTGTCTA-CCTTCAGT-3'	Klonierung von <i>RedStar</i> in pDsRed2-C1 (<i>XhoI</i>)

Tab. 2 (Fortsetzung): Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
5' Red-VP2	5'-TAT <u>GAATTCT</u> TCACCCACAGTAGAGG-3'	Klonierung von VP2 u. VP2H310A1 in pEGFP-C1 (<i>EcoRI</i>)
3' Red-VP2	5'-TTAG <u>TCTGACTT</u> ACTGGTGCCCGGCCAA-3'	Klonierung von VP2 u. VP2H310A1 in pEGFP-C1 (<i>Sall</i>)
2A-light/5'	5'-GGACAACAATCAGGGGCAGTAT-3'	Real-time PCR von 2A
2A-light/3'	5'-GCTCACTAAGAGGTCTCTGTTGTA-3'	Real-time PCR von 2A
3C-light/5'	5'-ATGTTGGGCATTTATGATAGG-3'	Real-time PCR von 3C
3C-light/3'	5'-TAAGAAGCCTCTGATGTCTCTGAA-3'	Real-time PCR von 3C
Siva-light/5'	5'-CGCTACTCGCAGGAGGTCTTCGAGA-3'	Real-time PCR von Siva
Siva-light/3'	5'-CTTTGGGGACTCTGGCAGGTGAACG-3'	Real-time PCR von Siva
5'T3-Siva	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGGATGAGGCGGCCGG-GGAGCTGCG-3'	<i>in vitro</i> -Transkription von Siva
3'T3-Siva/B	5'- <u>TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT</u> TAGGTCT-CGAACATGGCACAGCTGGTGC-3'	<i>in vitro</i> -Transkription von Siva
5'T3-VP2/B	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGGATGTCCCCCACAGT-AGAGGAGTGCCG-3'	<i>in vitro</i> -Transkription von VP2
3'T3-VP2/B	5'- <u>TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT</u> TAAGTGGT-GCCCGGCCAAACGTAGTCC-3'	<i>in vitro</i> -Transkription von VP2
5'T3-EGFP	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGGATGGTGAGCAAGG-GCGAGGAGCTGTTACCG-3'	<i>in vitro</i> -Transkription von EGFP
3'T3-EGFP	5'- <u>TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT</u> TAAGTTG-TACAGCTCGTCCATGCCG-3'	<i>in vitro</i> -Transkription von EGFP
5'-hu- β -Aktin	5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'	Nachweis von hu- β -Aktin
3'-hu- β -Aktin	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'	Nachweis von hu- β -Aktin
Oligo-dT ₁₈	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Reverse Transkription

3.5. Methoden zum Nachweis von Apoptose

3.5.1. Nachweis der Aktivierung von Caspasen

Nachweis mittels Western Blot:

Für die Analyse der Prozessierung der pro-Caspasen bzw. der Proteolyse von Substratproteinen wurden die zu untersuchenden Zellextrakte (s. 3.3.4.) mittels SDS-PAGE

(s. 3.3.5.) aufgetrennt und im Western Blot (s. 3.3.6.) die spezifischen Caspase- bzw. Caspase-Substratprotein-Antikörper eingesetzt.

Nachweis mittels colorimetrischer Tests:

Um eine Aktivität von Caspasen mit Hilfe colorimetrischer Substrate zu bestimmen, wurden die zu analysierenden Zellen pelletiert und in Caspase-Assay-Puffer resuspendiert (Volumen je nach Zellzahl zwischen 50 µl und 100 µl) und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (14000 U/min, 4 °C, 20 min) wurden die Überstände abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mittels Bradford-Test (s. 3.3.4.). Anschließend wurde in eine 96-well Zellkulturplatte in Parallelansätzen 30 µg Protein pipettiert und mit Caspase-Assay-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 95 µl gebracht. Nach Zugabe von 5 µl des colorimetrischen Caspase-Substrats [bei dem die spezifische Caspase-Erkennungssequenz mit dem Chromophor p-Nitroanilin (pNA; 1-Amino-4-nitrobenzol) konjugiert vorliegt] wurde die Platte für 30 s geschüttelt (im „Mikroplate Reader Dynatech MR5000“) und bei 37 °C inkubiert. Dabei war die Dauer der Inkubation abhängig von der Intensität der Färbung (4 h bzw. 20 h), die durch die Abspaltung der pNA-Gruppe hervorgerufen wurde und bei 405 nm messbar war („Mikroplate Reader Dynatech MR5000“).

- Caspase-Assay-Puffer: 20 mM HEPES pH 7,4; 0,1M NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM DTT; 0,1% CHAPS; 10% Sucrose
- Colorimetrisches Caspase-3-Substrat: Ac-DEVD-pNA (Biosource # 77-900) als 4 mM Stammlösung in DMSO resuspendiert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt; Endkonzentration im Test 200 µM
- Colorimetrisches Caspase-8-Substrat: Ac-IETD-pNA (Biosource # 77-855), Konz. entsprechend Casp-3-Substrat
- Colorimetrisches Caspase-9-Substrat: Ac-LEHD-pNA (Biosource # 78-136), Konz. entsprechend Casp-3-Substrat

Nachweis mittels luminometrischer Assays:

Um verschiedene Caspase-Aktivitäten mittels Lumineszenz bestimmen zu können, wurden die „Caspase-Glo® 3/7“- , „Caspase-Glo® 8“- bzw. „Caspase-Glo® 9“-Assays von Promega eingesetzt. Dabei werden Substrate mit den spezifischen Erkennungssequenzen der Casp-3/7, Casp-8 oder Casp-9 verwendet, die nach ihrer Spaltung Aminoluciferin freisetzen, das Substrat der Luciferase (thermostabile „Ultra-Glo™ recombinant Luciferase“), so dass die aus dieser Reaktion resultierenden Lichtsignale im Luminometer detektiert werden können. Bei diesen homogenen Tests wurden die zu untersuchenden Zellen mit einer Reagenzlösung versetzt, die zur Lyse der Zellen führte und gleichzeitig das spezifische Caspase-Substrat, sowie die Luciferase enthielt.

GMK-, Jurkat- bzw. 293-Zellen wurden in geeignete 96-well Zellkulturplatten ausgesät und mit CVB3H3 infiziert (m.o.i. 3). Die Infektion erfolgte derart, dass alle Proben zum gleichen Zeitpunkt mit dem Caspase-Glo[®]-Reagenz (Volumenverhältnis 1:1) versetzt werden konnten. Zum Mischen der Proben wurde die Platte für 30 sek. bei 500 U/min geschüttelt und anschliessend für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Lumineszenz gemessen wurde. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung bestimmt.

- Luminometerplatten: NUNC[™], # 165306, 96 well „Optical Btm Plt PolymerBase, white“
- Luminometer: „MLX 2 Microtiter[®] Plate Luminometer“ (Dynex Technologies)
- Plattenschüttler: Heidolph „TITRAMAX 100“

3.5.2. Analyse der Cytochrom C-Freisetzung

Um die Lokalisierung des Cytochrom C (Cyt C) bestimmen zu können, wurden die Zellpellets (3000 U/min, 6 min) in CFB-Puffer („cytosolic fraction buffer“) aufgenommen (3×10^7 Zellen/ml) und 5 min auf Eis inkubiert. Die Digitonin-vermittelte Lyse wurde mittels Trypanblaufärbung (s. 3.1.2.) überprüft. Nach Zentrifugation (3000 U/min, 5 min, 4 °C) wurden die Überstände (zytosolische Fraktionen) bei -70 °C aufbewahrt. Nach Resuspension der Pellets in MFB-Puffer („mitochondrial fraction buffer“) und erneuter Zentrifugation (14000 U/min, 10 min, 4 °C) wurden die Überstände (mitochondriale Fraktionen) ebenfalls bei -70 °C gelagert. Die weitere Verarbeitung der Proben beinhaltete nach Proteinkonzentrationsbestimmung (s. 3.3.4.) und SDS-PAGE (s. 3.3.5.) einen Western Blot (s. 3.3.6.) mit Cyt C-spezifischen Antikörpern.

- CFB-Puffer: 250 mM Sucrose; 70 mM KCl; 137 mM NaCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄; frisch zugesetzt 250 µg/ml_{EtOH} Digitonin (Calbiochem, Stammlösung: 25 mg/ml, 1 Woche bei 4°C haltbar)
- MFB-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,2% Triton X-100; 0,3% NP-40

3.5.3. Isolierung chromosomaler DNA zum Nachweis der DNA-Fragmentierung

Nach zweimaliger Wäsche der Zellpellets (3000 U/min, 6 min) mit kaltem PBS wurden diese in 200 µl PBS resuspendiert und mit Lysepuffer A (200 µl) sowie H₂O (600 µl) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 3400 U/min) wurden die Pellets erneut in Lysepuffer A (250 µl) und H₂O (750 µl) aufgenommen, gevortext und zentrifugiert (15 min, 3400 U/min). Zur Lyse der Zellkerne wurde das Pellet anschließend in Lysepuffer B (500 µl) resuspendiert, gevortext (20 s) und mit QIAGEN-Protease (12,5 µl) versetzt. Nach Inkubation für 1 h, bei 50 °C erfolgte eine Ethanol fällung. Dazu wurden die Proben mit 1/10 Vol. Na-Acetat (3 M, pH 5,2) und 2 Vol. 96% Ethanol versetzt und für 20 min bei 4 °C und 14000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in

TE-Puffer resuspendiert (in der Regel 100 µl). Wenn erforderlich, wurde die DNA für 1 h bis 2 h bei 55 °C inkubiert, um sie besser zu lösen. Die Analyse erfolgte in einem 1,5%-igen Agarosegel.

- Lysepuffer A: 1,28 M Sucrose; 40 mM Tris/HCl, pH 7,5; 20 mM MgCl₂; 4% Triton X-100
- Lysepuffer B: 0,8 M Guanidinhydrochlorid; 30 mM Tris/HCl, pH 8; 5% Tween-20; 0,5% Triton X-100

3.5.4. Nachweis der DNA-Fragmentierung mittels „ApoAlert™ Ladder Assay“

Eine sensitive Methode um die DNA-Fragmentierung zu untersuchen, stellt der „ApoAlert™ LM-PCR Ladder Assay“ (BD Biosciences) dar. In Proben, in denen nur ein geringer Anteil der Zellen apoptotisch ist, wird ein Amplifikationsschritt zur Sichtbarmachung der „DNA-Leiter“ eingeführt. Bei dieser LM-PCR (ligation-mediated PCR) werden an die, im Verlauf der Apoptose entstandenen, zellulären DNA-Fragmente (5'-phosphoryliert, blunt end) dephosphorylierte Adapter (24-mer) ligiert. Die so entstehenden verlängerten 5'-Enden werden aufgefüllt und die Adapter fungieren in anschließenden PCR-Zyklen als Primer, so dass es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA-Fragmente kommt, die im Agarosegel analysiert werden kann. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Isolierung der chromosomalen DNA (s. 3.5.3.) erfolgte über Nacht die Ligation der Adapter, wobei 0,5 µg DNA verwendet wurden. Von dieser DNA wurden anschließend 150 ng in eine PCR eingesetzt, deren Zyklenzahl für jedes Experiment optimiert wurde. Dabei wurde der 50x Advantage 2 Polymerase Mix von BD Biosciences und folgende PCR-Bedingungen verwendet: 8 min 72 °C//~23 Zyklen: 1 min 94 °C/3 min in 72 °C//15 min 72 °C. Die Analyse des gesamten PCR-Ansatzes erfolgte im 1,5%-igen Agarosegel.

3.5.5. Zellkernfärbung mit Hoechst-33342

Um die Kondensation des Chromatins zu untersuchen, wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst-33342 (Sigma) angefärbt. Hoechst-33342 ist membran-permeabel und interkaliert in A-T-Regionen der DNA. Zur Anfärbung wurde den Zellen der Farbstoff in einer Endkonzentration von 4 µM ins Medium zugegeben, 10 min im Brutschrank inkubiert und die Zellen, entweder sofort oder nach Fixierung mit Paraformaldehyd (s. 3.1.2.) zu einem späteren Zeitpunkt, fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Je Präparat wurden 3 Bereiche mit mindestens 100 Zellkernen ausgezählt und der Anteil der Kerne mit kondensiertem Chromatin durch Bildung des Mittelwertes bestimmt.

- Hoechst-33342 Stammlösung: 2 mM in H₂O (Aufbewahrung bei 4 °C im Dunkeln)

3.5.6. Apoptose Gen-Array

Für die Analyse der Expression von Genen mit Funktionen in der Apoptose wurde ein „DNA-Microarray“ der Firma SuperArray Bioscience Corporation verwendet und den Herstellerangaben gemäß verfahren. Dazu wurde aus nicht infizierten bzw. CVB3H3-infizierten 293 Zellen 8 h p. i. die Gesamt-RNA mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (QIAGEN) isoliert. Je 5 µg dieser RNA wurden in cDNA umgeschrieben, die anschließend mit Gen-spezifischen Primern und unter Verwendung von Biotin-16-dUTP linear amplifiziert und markiert wurde. Die Hybridisierung dieser cDNA-Proben mit den Array-Membranen erfolgte über Nacht bei 60 °C und leichter Rotation (7 U/min) im Hybridisierungssofen. Nach Blockierung und Wäsche der hybridisierten Membranen wurde Alkalische-Phosphatase-konjugiertes Streptavidin zugegeben (Verdünnung 1:8000), das die Detektion der gebundenen, Biotin-markierten cDNA-Proben mittels Chemilumineszenz ermöglichte. Dafür wurden die Filme für 30-60 s belichtet und anschließend densitometrisch unter Verwendung der Software von SuperArray („Scan Alyze version 2.50“ und „GEArray Analyzer 1.3“) ausgewertet. Dabei wurden die Signale nach Abzug der Hintergrundfärbung (gleichgesetzt mit dem kleinsten gemessenen Wert auf der Membran) normalisiert auf (geteilt durch) die Expressionswerte eines mitgeführten positiven Kontrollgens (Haushaltsgen GAPDH oder β -Aktin). Damit konnten die Expressionswerte der beiden Membranen (infiziert und nicht infiziert) miteinander verglichen werden, indem die entsprechenden Verhältnisse zwischen ihnen berechnet wurden.

- DNA-Microarray: #HS-002 human Apoptosis, GEArray Q Series (SuperArray Bioscience Corporation)
- Chemilumineszenz-Filme: Kodak® „Chemiluminescence BioMax Light Film“ (Sigma Aldrich # 8689358)

4.1. Untersuchung der Siva-Expression *in vitro*

4.1.1. *siva*-Transkription nach Infektion von 293-Zellen mit CVB3H3 und CVB3H310A1

Wie *in vivo* Ergebnisse zeigten, ist eine effiziente Wechselwirkung zwischen dem viralen Kapsidprotein VP2 und dem Wirtszellprotein Siva, verbunden mit einer Induktion der *siva*-Transkription und der Apoptose, für die Virusausbreitung von CVB3H3 und dessen Pathogenität im Mausmodell von Bedeutung [75]. Die weniger pathogene Virusvariante CVB3H310A1, die sich nur durch einen Aminosäureaustausch an Position 165 im VP2-Protein von CVB3H3 unterscheidet [97], ist nicht in der Lage, effizient mit Siva zu interagieren. Damit verbunden ist eine verringerte Induktion der Apoptose und eine Beeinträchtigung der Virusausbreitung im Versuchstier [75]. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die unterschiedliche Fähigkeit von CVB3H3 und CVB3H310A1 zur Induktion der *siva*-Transkription und Apoptose auch *in vitro* zu finden ist, unabhängig von den komplexen Bedingungen *in vivo* und den unterschiedlichen virusspezifischen Immunantworten des Wirts. Dazu wurden 293-Zellen mit den Viren CVB3H3 bzw. CVB3H310A1 infiziert (m.o.i. 10) und zu den angegebenen Zeiten Proben für die Isolierung der RNA und eine anschließende RT-PCR genommen. Abbildung 5 zeigt, dass bei einer Infektion mit CVB3H3 eine erhöhte Transkription des Siva-Gens 3 h und 7 h p. i. induziert wurde, während die Infektion mit der CVB3H310A1-Variante zu keiner erhöhten Transkription führte. Die Amplifizierung des viralen VP2 sowie des zellulären β -Aktins diente zur Kontrolle der vergleichbaren Virusinfektion bzw. der RNA-Aufarbeitung.

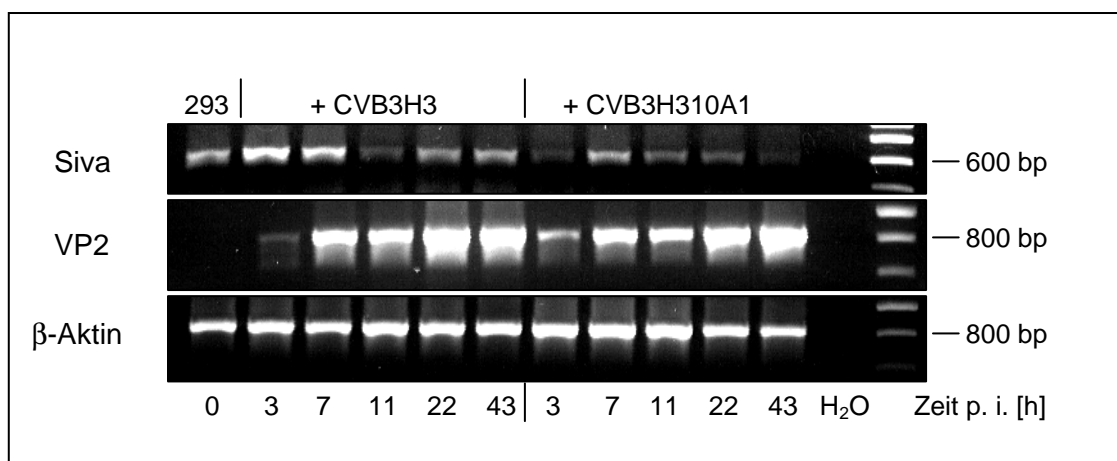


Abb. 5: Nachweis der Induktion der *siva*-Transkription durch CVB3H3, jedoch nicht durch CVB3H310A1 *in vitro*. 293-Zellen wurden mit Virus (m.o.i. 10) infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Probennahme für die RNA Präparation und RT-PCR.

4.1.2. Expression von Siva auf Proteinebene

Die Synthese des Siva-Proteins in 293-Zellen wurde in verschiedenen Western Blots untersucht, wobei es weder mit kommerziellen noch mit eigenen Antikörpern möglich war eine spezifische Bande zu detektieren, unabhängig davon ob die Zellen infiziert oder nicht infiziert waren. Auch die Verwendung anderer Zelllinien mit nachweisbarer Siva-mRNA Expression führte zu ähnlichen Ergebnissen. Nur in Jurkat-Zellen war der Nachweis entsprechender Signale möglich, wobei sowohl Siva-1 (20 kDa) als auch die Spleißvariante Siva-2 (14 kDa) erkennbar waren, deren Intensität jedoch nicht durch die Infektion der Zellen mit CVB3H3 beeinflusst wurde (Abb. 6). Der Nachweis des viralen Kapsidproteins VP2 (scheinbares Molekulargewicht 31 kDa) diente zur Kontrolle der Infektion.

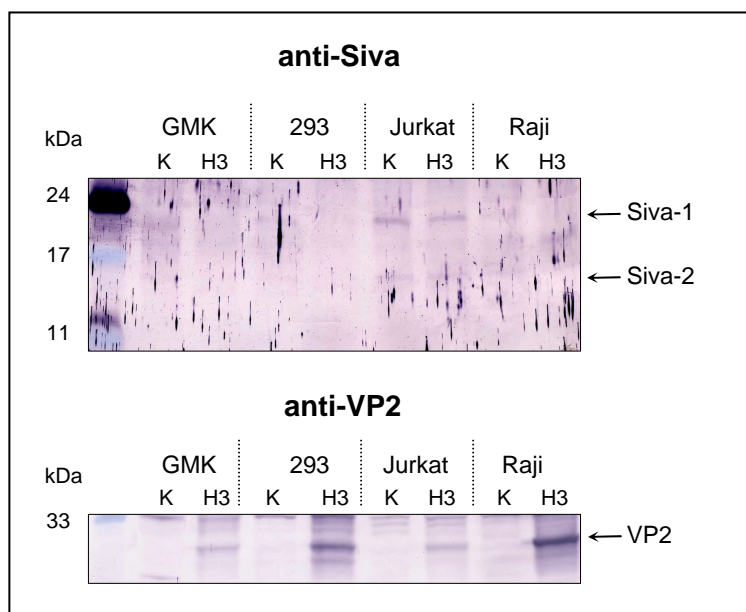


Abb. 6: Expression von Siva in verschiedenen Zelllinien sowie nach deren Infektion mit CVB3H3. Die Zellen wurden infiziert (m.o.i. 5) und nach 8 h Proben entnommen („H3“: CVB3H3-infiziert; „K“: nicht infizierte Kontrolle). Je 100 µg Protein wurden auf einem 15%-igen (bzw. 12,5%-igen) SDS-PAA- Gel aufgetrennt und im Western Blot auf die Expression von Siva bzw. VP2 untersucht.

Um die Relevanz der Wechselwirkung zwischen dem coxsackieviralen Kapsidprotein VP2 und dem proapoptotischen Wirtsprotein Siva für die Induktion von Apoptoseprozessen *in vitro* näher charakterisieren zu können, sollten daher beide Proteine in der Zellkultur überexprimiert werden.

4.2. Expression des VP2-Kapsidproteins und des Interaktionspartners Siva

4.2.1. Induzierbare Expression mit Hilfe des Tet-On Systems

Für eine regulierbare Genexpression wurde das Tet-On System der Firma Clontech gewählt, bei welchem erst durch die Zugabe von Tetrazyklin oder seinem Derivat Doxzyzyklin die

Genexpression induziert wird. Die Grundlage des Systems stellt das Tetrazyklin-Resistenz-Operon von *E. coli* dar. Die Expression der Gene dieses Operons werden durch die Bindung des Tet-Repressors an die Tet-Operatorsequenzen blockiert solange kein Tetrazyklin vorhanden ist. Beide Komponenten – Tet-Repressor und Tet-Operator – finden sich im Tet-On System (Abb. 7).

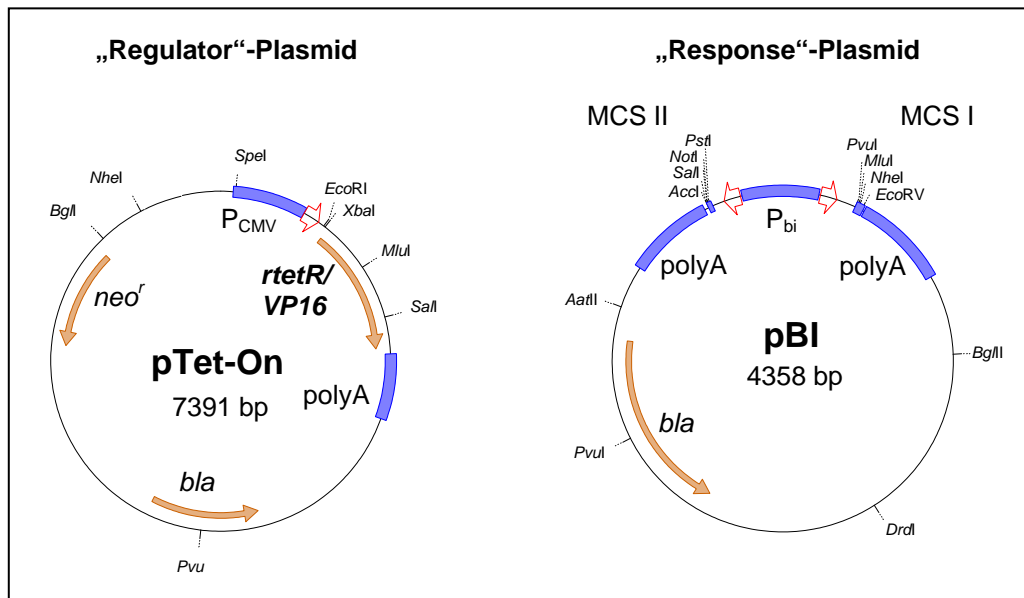


Abb. 7: Komponenten des induzierbaren Tet-On Expressionssystems. Das „Regulator“-Plasmid kodiert für einen Doxzyklin-abhängigen Transaktivator (rTetR/VP16), der aus einer Fusion des Tet-Repressors (rTetR) und der VP16-Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus besteht. Durch Bindung an die Tet-Operatorsequenz kann rTetR/VP16 die Transkription des bidirektionalen Promoters (P_{bi}) des „Response“-Plasmids in Anwesenheit von Doxzyklin aktivieren. MCS: „multiple cloning site“

Auf dem sogenannten „Regulator-Plasmid“ (pTet-On) wird der Tet-Repressor kodiert, der in zweifacher Hinsicht abgewandelt wurde. Zum einen entstand durch die Fusion des Tet-Repressors mit einer Transkriptionsaktivierungsdomäne – dem C-Terminus des VP16-Proteins des Herpes simplex Virus – ein Hybridprotein, das nun statt einer repressorischen Funktion eine transaktivierende besitzt. Zum anderen führten 4 Aminosäuresubstitutionen in der Tet-Repressorsequenz zu einem „reversen“ Repressor, der die Tet-Operatorsequenzen nicht in Abwesenheit von Tetrazyklin oder Doxzyklin bindet, sondern in Anwesenheit der Antibiotika. Dieses Hybridprotein wird konstitutiv von einer stabil integrierten Kopie des „Regulator“-Plasmids exprimiert. Die Tet-Operatorsequenz als zweite Komponente des Tet-On Systems befindet sich auf dem „Response“-Plasmid. Dieses Plasmid kodiert für das gewünschte zu exprimierende Gen, das unter der Kontrolle eines minimalen CMV-Promoters steht, dem unmittelbar am 5'-Ende 7 Kopien der Tet-Operatorsequenz vorgeschaltet sind. Erst bei Zugabe von Tetrazyklin bzw. Doxzyklin ins Kulturmedium bindet der abgewandelte Tet-Repressor an die Operatorsequenzen und führt zur Transkription des inserierten Gens. Bei der Wahl des „Response-Plasmids“ gibt es die Möglichkeit bidirektionale Vektoren („pBI“)

zu verwenden. Bei diesen Vektoren stehen zwei identische, minimale CMV-Promoter in entgegengesetzter Orientierung unter der Kontrolle der 7 Kopien der Tet-Operatorsequenz, so dass die simultane Expression zweier verschiedener Gene in einer Zelle möglich ist (Abb. 7).

Der pBI-Vektor sollte verwendet werden, um VP2 und Siva induzierbar zu exprimieren. Dazu wurde die kodierende Sequenz für VP2 bzw. Siva in die multiple Klonierungsstelle II (MCS II) inseriert und für eine vereinfachte Selektion die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein EGFP (27 kDa) in die multiple Klonierungsstelle I (MCS I) kloniert. Dadurch können transfizierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop detektiert und mit Hilfe des FACS (fluorescence-activated cell sorting) von nicht transfizierten Zellen getrennt werden. Nach Kontrolle der Konstrukte pBI-EGFP-VP2 bzw. pBI-EGFP-Siva mittels Sequenzierung wurden diese in 293-Tet-On-Zellen (Clontech) transfiziert. Diese 293-Zellen enthalten, stabil integriert, das „Regulator-Plasmid“ pTet-On, besitzen damit eine Antibiotikumresistenz für Neomycin und ermöglichen nach Zugabe von Doxzyklin die Transkriptionsaktivierung von Genen unter Kontrolle der pBI-Promoter. Obwohl nach Transfektion von pBI-EGFP-Siva bzw. pBI-EGFP-VP2 und Zugabe von Doxzyklin die Expression des EGFP, mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot, nachgewiesen werden konnte, war weder die Expression von Siva noch die von VP2 im Western Blot sichtbar. Dabei wurden verschiedene Klone, sowohl transient als auch stabil transfiziert, getestet (Abb. 8, Spur 1 bzw. Spuren 1 + 2).

Um die Funktion der zwei verschiedenen Klonierungsstellen, MCS I und MCS II, zu überprüfen, wurden neue Vektoren hergestellt, in denen die Sequenzen revers inseriert wurden, so dass sich nun die EGFP-kodierende Sequenz in der MCS II und die von VP2 bzw. Siva in der MCS I befand (pBI-VP2-EGFP bzw. pBI-Siva-EGFP). Nach Transfektion und Induktion

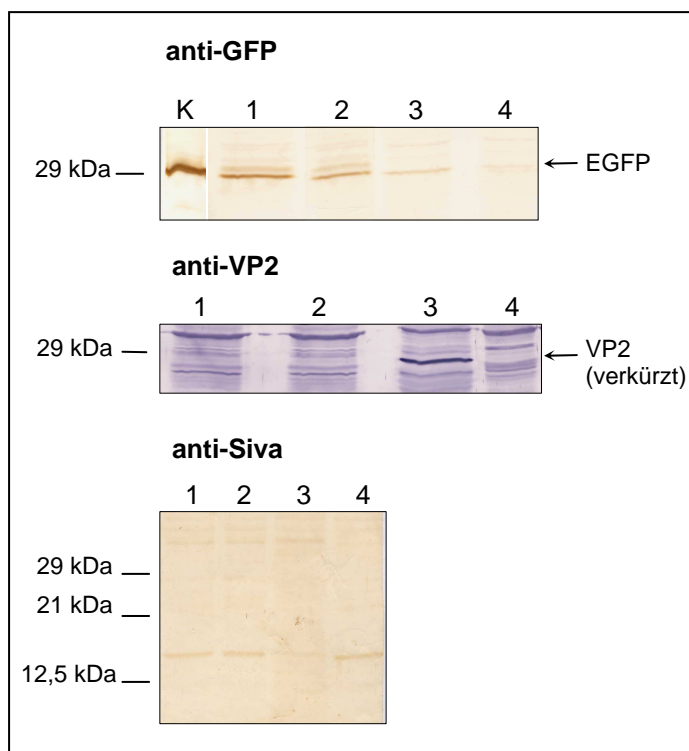


Abb. 8: Proteinexpression bei Verwendung beider Klonierungsstellen des bidirektionalen pBI-Systems.

293-Tet-On-Zellen wurden für 24 h transient transfiziert, anschließend für 24 h die Expression der pBI-Vektoren mit Doxzyklin induziert und je 40 µg Protein mittels Western Blot analysiert. Transfizierte Konstrukte anti-GFP Blot: Spur 1: pBI-EGFP-Siva; Spur 2: pBI-EGFP-VP2; Spur 3: pBI-Siva-EGFP; Spur 4: pBI-VP2-EGFP; K: pBI-EGFP (in MCS I inseriert)

Transfizierte Konstrukte anti-VP2 Blot: Spur 1: pBI-EGFP-VP2; Spur 2: pBI-VP2-EGFP; Spur 3: pBI-VP2-EGFP_{mutiert}; Spur 4: 293-Zellen

Transfizierte Konstrukte anti-Siva Blot: Spur 1: pBI-EGFP-Siva (stabil transfiziert, nicht induziert); Spur 2: pBI-EGFP-Siva (stabil transfiziert, 24 h induziert); Spur 3: pBI-Siva-EGFP; Spur 4: 293-Zellen

der korrekten Konstrukte in 293-Tet-On Zellen war mittels Fluoreszenzmikroskopie (nicht dargestellt) und Western Blot weder die Expression von EGFP noch von Siva oder VP2 detektierbar (Abb. 8). Interessanterweise war bei Verwendung einer Klonierungsmutante von pBI-VP2-EGFP, bei der vor die kodierende EGFP-Sequenz 70 nt inseriert waren, ein spezifisches Signal für VP2 im Western Blot erkennbar, mit etwas niedrigerem Molekulargewicht (~28 statt 31 kDa) als erwartet (pBI-VP2-EGFP_{mutiert}).

Die Schwierigkeiten, die gewünschten Proteine gleichzeitig zu exprimieren, traten auch bei Verwendung des pBI-EGFP Plasmids von Clontech (pBI-EGFP_C) auf, das bereits die EGFP-kodierende Sequenz in der MCS II trägt. Transiente Transfektionen von pBI-EGFP_C führten

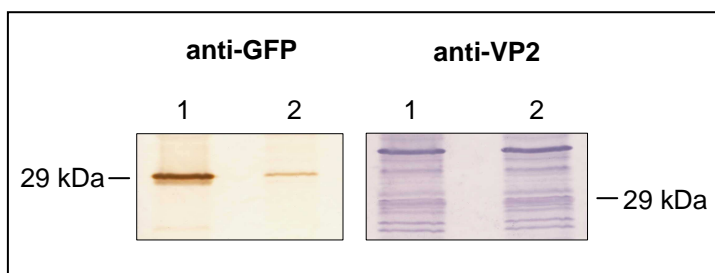


Abb. 9: Proteinexpression nach Transfektion von 293-Tet-On-Zellen mit pBI-EGFP und pBI-VP2-EGFP und Induktion für 24 h mit Doxyzyklin. Je 40 µg Protein wurden mittels Western Blot analysiert. Spur 1: pBI-EGFP_C; Spur 2: pBI-VP2-EGFP_C

zu deutlich nachweisbarer Expression von EGFP sowohl mittels Western Blot als auch mittels Fluoreszenzmikroskopie. Auch hier war nach Insertion der VP2-kodierenden Sequenz in die MCS I dieses Vektors keine VP2-Synthese zu sehen, während die EGFP-Expression zwar nachweisbar blieb, aber deutlich schwächer war als vor der Insertion (Abb. 9).

Eine effiziente Expression zweier Proteine, kodiert auf einem Vektor, war nach diesen Beobachtungen nicht nachweisbar. Daher sollte untersucht werden, inwieweit die Verwendung von nur einer MCS des pBI-Plasmids die gewünschte Proteinexpression ermöglicht. Die VP2- bzw. Siva-kodierenden Sequenzen wurden dazu in die MCS I des pBI-Vektors kloniert, die MCS II blieb frei. Nach ihrer Sequenzierung wurden die Konstrukte in 293-Tet-On Zellen transient transfiziert, mit Doxyzyklin induziert und die spezifische Proteinsynthese mittels Western Blot untersucht. Während keine Siva-spezifischen Signale detektiert werden konnten, waren verkürzte VP2-Fragmente schwach erkennbar (Abb. 10A, *). Dies wurde durch die Analyse der mRNA von transfizierten Zellen bestätigt. Während nach pBI-Siva-Transfektion keine gesteigerte Synthese der spezifischen mRNA zu sehen war, traten nach der Transfektion von pBI-VP2 mehrere verkürzte VP2-spezifische Banden auf (Abb. 10B, Spur 5). Wenn in die PCR statt der revers transkribierten cDNA („RT“) die RNA eingesetzt wurde, die nach der Isolierung noch nicht mit DNase I behandelt war, war die Amplifikation des VP2 in voller Länge möglich, so dass der Nachweis der vollständigen VP2-Sequenz in transfizierten Zellen zwar auf DNA-Ebene, aber nicht auf RNA-Ebene möglich war (Abb. 10B, Spur 1).

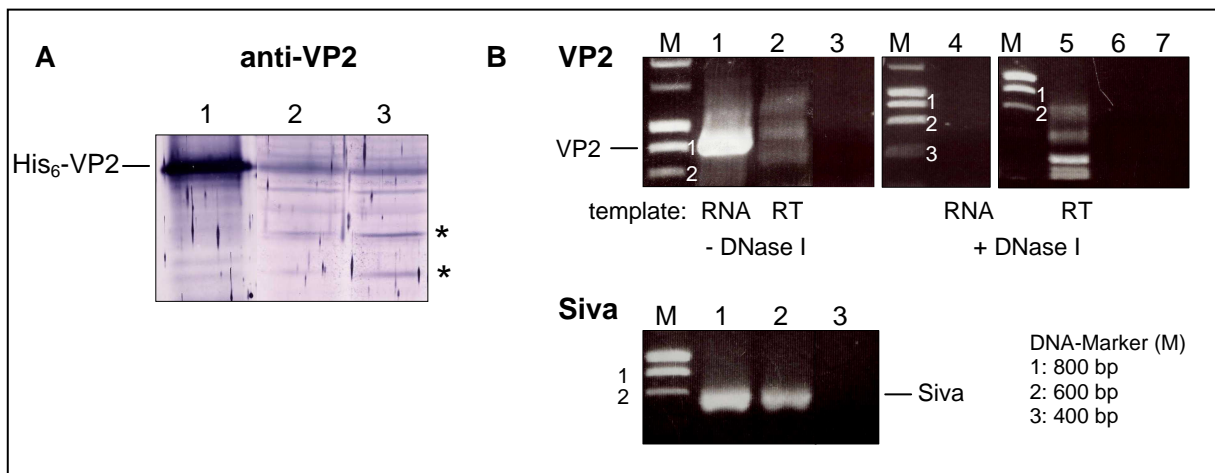


Abb. 10: Synthese verkürzter VP2-Fragmente bei alleiniger Verwendung der MCS I-Klonierungsstelle des pBI-Vektors. 293-Tet-On-Zellen wurden transient transfiziert (24 h) und anschließend mit Doxzyklin induziert (24 h).

A: anti-VP2 Western Blot. Spur 1: His₆-VP2; Spur 2: Transfektion von pBI-Siva (Negativkontrolle); Spur 3: Transfektion von pBI-VP2 (je 80 µg Protein/ Spur 2 bzw. 3), *: verkürzte VP2-spezifische Signale

B: VP2-spezifische PCR. Template: Spur 1: RNA (keine DNase I-Behandlung) nach Transfektion von pBI-VP2; Spur 2: RT (keine DNase I-Behandlung der RNA) nach Transfektion von pBI-VP2; Spur 3: H₂O-Kontrolle; Spur 4: RNA (nach DNase I-Behandlung) nach Transfektion von pBI-VP2; Spur 5: RT (nach DNase I-Behandlung der RNA) nach Transfektion von pBI-VP2; Spur 6: RT (nach DNase I-Behandlung der RNA) nach Transfektion von pBI-Siva (Negativkontrolle); Spur 7: H₂O-Kontrolle

Siva-spezifische PCR. Template: Spur 1: RT (nach DNase I-Behandlung der RNA) nach Transfektion von pBI-VP2 (Negativkontrolle); Spur 2: RT (nach DNase I-Behandlung der RNA) nach Transfektion

In einem weiteren Versuch zur rekombinanten Expression des VP2-Proteins wurde der pIRESpuro2-Vektor (Clontech) verwendet, der die konstitutive Transkription zweier offener Leserahmen unter Kontrolle des CMV-Promoters erlaubt, was durch eine interne

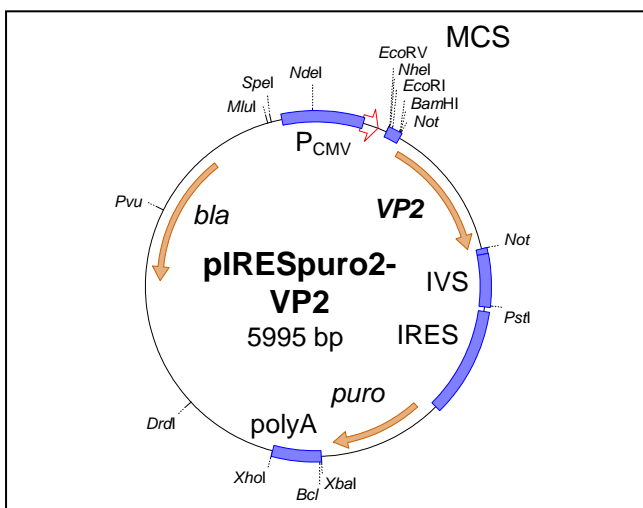


Abb. 11: pIRES-Vektor für die konstitutive Expression einer bicistronischen mRNA, kodierend für VP2 und die Puromycinresistenz. MCS: „multiple cloning site“, IVS: „intervening sequence“, IRES: „internal ribosome entry site“

Ribosomeneintrittsstelle (IRES) zwischen den beiden Leserahmen ermöglicht wird (Abb. 11). Im pIRESpuro2-Plasmid ist nach der IRES die Sequenz für die Puromycinresistenz inseriert, so dass transfizierte Zellen, die Puromycin-resistent sind, auch die DNA des ersten offenen Leserahmens transkribiert haben müssen. Nach Konstruktion von pIRESpuro2-VP2 und stabiler Transfektion in 293-Zellen wurde im Western Blot zwar ein VP2-spezifisches Signal detektiert, allerdings wie im Falle des pBI-VP2-

EGFP_{mutiert}-Konstrukts (Abb. 8), mit geringerem Molekulargewicht (~28 statt 31 kDa) als erwartet (*). Auch revers transkribierte cDNA aus stabil transfizierten pRESpuro2-VP2-transfizierten Zellen zeigte in VP2-spezifischen PCR's kein stabiles Produkt. Es konnten nur Fragmente von ca. 300, 600 oder 800 bp amplifiziert werden (Abb. 12).

Trotz verschiedener Ansätze war es also weder möglich eine Expression von Siva bzw. eine stabile Expression des vollständigen VP2-Proteins in der Zellkultur zu etablieren.

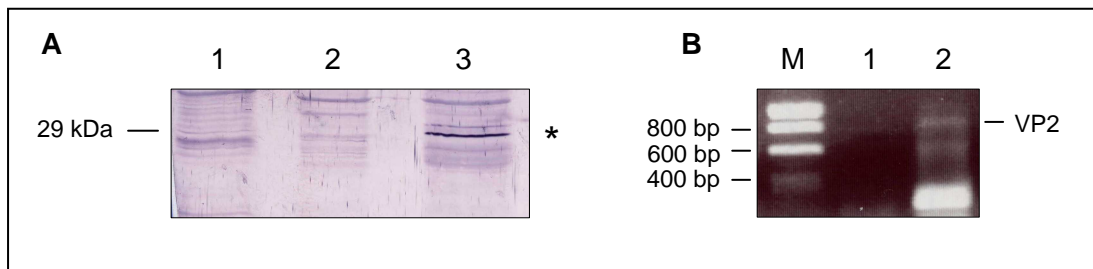


Abb. 12: Synthese verkürzter VP2-Fragmente bei Verwendung des konstitutiv exprimierenden pRESpuro2-Vektors.

A: anti-VP2 Western Blot. Spur 1: stabile Transfektion von pRESpuro2-VP2; Spur 2: 293-Zellen; Spur 3: pBI-VP2-EGFP_{mutiert}, transient transfiziert und induziert; (je 20 µg Protein/Spur); *: verkürztes VP2-spezifisches Signal

B: VP2- spezifische PCR. Template: Spur 1: RT aus nicht transfizierten 293-Zellen; Spur 2: RT aus 293-Zellen, stabil transfiziert mit pRESpuro2-VP2; M: DNA-Marker

4.2.2. *In vitro*-Transkription der Kapsidproteine VP2 und VP2H310A1

Um eine weitere Möglichkeit zu testen, die VP2-Kapsidproteine von CVB3H3 bzw. CVB3H310A1 in der Zellkultur zu exprimieren, wurden die kodierenden Sequenzen *in vitro* transkribiert. Als template dienten dafür PCR-Fragmente, deren 5'-Ende die Promotersequenz für die T3-Polymerase kodierte. Die *in vitro* transkribierte RNA wurde mit DNase I

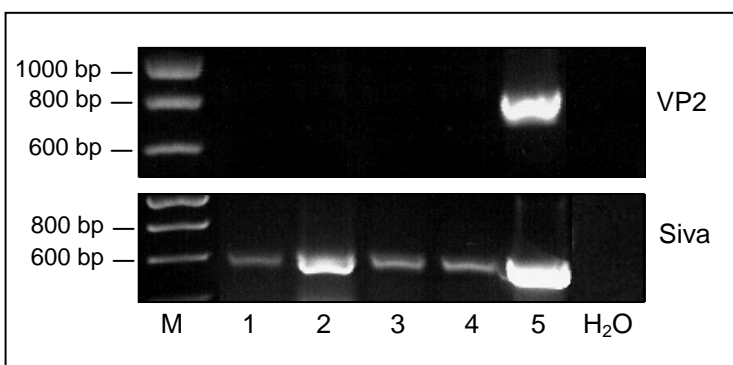


Abb. 13: Fehlender Nachweis von VP2-spezifischer RNA nach *in vitro*-Transkription und Transfektion in 293-Zellen. 293-Zellen wurden für 24 h mit 1,6 µg RNA transfiziert und nach Isolierung der RNA und RT-PCR auf das Vorhandensein von VP2- bzw. Siva-spezifischen Sequenzen untersucht. M: DNA-Marker; Spur 1: 293-Zellen; Spur 2: + Siva-RNA; Spur 3: + VP2-RNA; Spur 4: +VP2H310A1-RNA; Spur 5: PCR-Positivkontrolle (Plasmid); H₂O: PCR-Negativkontrolle

verdaut, gereinigt und in 293-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurde aus diesen Zellen die RNA isoliert und nach RT auf das Vorhandensein VP2-kodierender Sequenzen untersucht. Auf die gleiche Weise synthetisierte und transfizierte Siva- bzw. EGFP-Transkripte dienten als Kontrolle der Methode. Abbildung 13 zeigt, dass keine VP2-spezifischen Produkte amplifiziert werden

konnten, die mRNA Konzentration von Siva in den entsprechend transfizierten Zellen aber deutlich erhöht war. Im Western Blot konnte jedoch keine Translation dieser Siva-RNA nachgewiesen werden, obwohl nach Transfektion von EGFP-RNA grün fluoreszierende Zellen sichtbar waren, die für eine generelle Translatierbarkeit der *in vitro*-synthetisierten RNA sprachen.

4.2.3. Transiente Expression von VP2 und Siva als Fusionsproteine mit EGFP

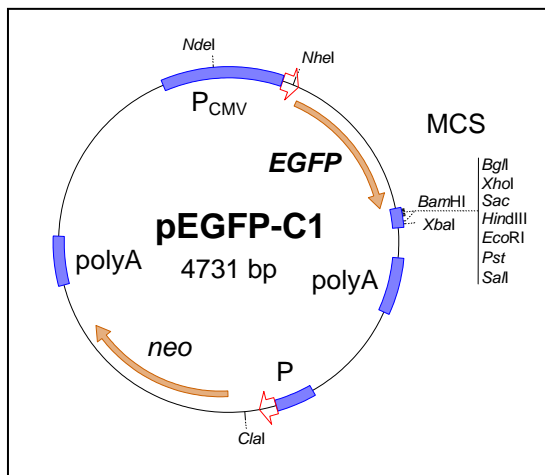


Abb. 14: Vektor für die Expression rekombinanter Proteine, die mit dem C-Terminus des EGFP fusioniert sind. MCS: „multiple cloning site“

Trotz verschiedener Ansätze zur Expression des VP2-Proteins bzw. von Siva mit Hilfe induzierbarer oder konstitutiv exprimierender Systeme war keine ausreichende Synthese, weder auf RNA- noch auf Proteinebene und weder bei transienten noch bei stabilen Transfektionen, zu erreichen. Aus diesem Grund wurde die Möglichkeit der Expression dieser Proteine als C-terminale Fusion mit EGFP gewählt (Abb. 14), die eine Synthese des EGFP-, EGFP/Siva-, EGFP/VP2- und EGFP/VP2H310A1-Proteins in 293-Zellen ermöglichte. Abbildung 15 zeigt ein Beispiel für

fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach transienter Transfektion der entsprechenden Plasmide. Wie in der Literatur beschrieben [146], führte die Expression des Siva-Proteins zu einer deutlich veränderten Morphologie der Zellen, die häufig kleiner, abgerundet oder bereits zerfallen waren. Bei der Fusion der VP2-Kapsidproteine mit EGFP war die Intensität der EGFP-Fluoreszenz deutlich schwächer, die Transfektionseffizienz unter vergleichbaren Bedingungen niedriger, aber die Zellmorphologie vergleichbar mit der der EGFP-exprimie-

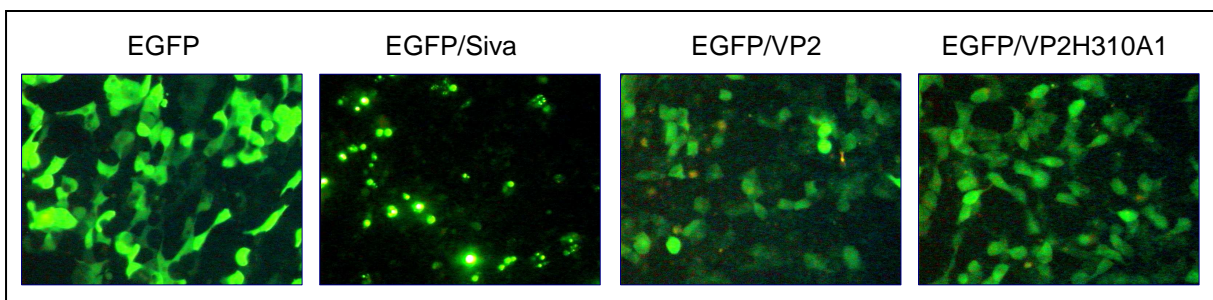


Abb. 15: Veränderung der Zellmorphologie nach transienter Expression von EGFP/Siva in 293-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme transienter Transfektion (2 Tage) des EGFP bzw. der Fusionsproteine EGFP/Siva, EGFP/VP2 und EGFP/VP2H310A1 in 293-Zellen. Vergrößerung: 400x

renden Kontrollzellen. Signifikante morphologische Unterschiede zwischen EGFP/VP2- und EGFP/VP2H310A1-exprimierenden Zellen waren nicht sichtbar.

Um die Auswirkung der Expression der rekombinanten Proteine auf die Induktion apoptotischer Prozesse zu untersuchen, wurde die chromosomale DNA isoliert und hinsichtlich ihrer Fragmentierung untersucht. Publiizierte Daten zeigen, dass eine transiente Überexpression von Siva eine DNA-Fragmentierung hervorruft [146]. Dies könnte, aufgrund der Wechselwirkung des VP2-Proteins mit Siva und der damit verbundenen Induktion der Apoptose *in vivo*, auch bei einer Expression des viralen Kapsidproteins *in vitro* vermutet werden. Wie Abbildung 16 darstellt, konnte allerdings weder bei einer transienten Expression von EGFP/Siva noch der von EGFP/VP2 bzw. EGFP/VP2H310A1 eine Veränderung der chromosomalen DNA im Agarosegel detektiert werden. Dieses Ergebnis trat reproduzierbar bei guter Transfektionseffizienz (>50%) auf und steht, zumindest in Bezug auf Siva, im Gegensatz zu Daten von Prasad *et al.* (1997).

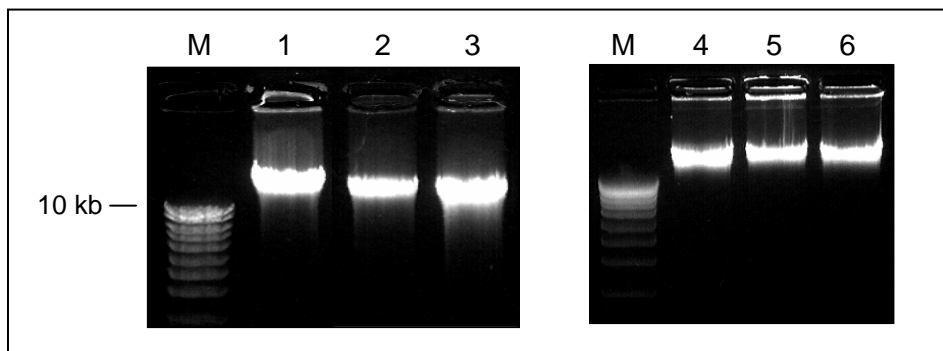


Abb. 16: Fehlender Nachweis der Fragmentierung chromosomaler DNA nach transienter Transfektion. 293-Zellen wurden für 2 Tage transfiziert, die chromosomale DNA isoliert und je 2 µg auf dem Agarosegel analysiert. M: DNA-Marker; Spur 1 + 4: 293-Zellen; Spur 2: EGFP-Expression; Spur 3: EGFP/Siva-Expression; Spur 5: EGFP/VP2-Expression; Spur 6: EGFP/VP2H310A1-Expression

Um eine höhere Sensitivität bei diesem Test zu erreichen, wurde die DNA-Fragmentierung nach transienter Transfektion mit Hilfe des „ApoAlert™ Ladder Assays“ (BD Biosciences) analysiert. Mit dieser Methode können apoptotisch entstandene DNA-Fragmente vor der Analyse im Agarosegel amplifiziert und sichtbar gemacht werden, so dass auch der Nachweis eines geringeren Anteils apoptotischer Zellen möglich wird. Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass die transiente Expression von EGFP/Siva zu einer erhöhten Fragmentierung der DNA führte, sichtbar im Agarosegel in Form von Multimeren der Nukleosomen von ~180 bp (Abb. 17). Dagegen hatte die transiente Expression der Proteine EGFP/VP2 bzw. EGFP/VP2H310A1 keinen deutlichen Effekt auf die Fragmentierung der DNA. Während bei der Synthese von EGFP/VP2 eine schwache Zunahme der DNA-Fragmentierung erkennbar war, war diese im Falle der EGFP/VP2H310A1-Expression nicht erhöht, sondern vergleichbar mit der EGFP-Kontrollprobe.

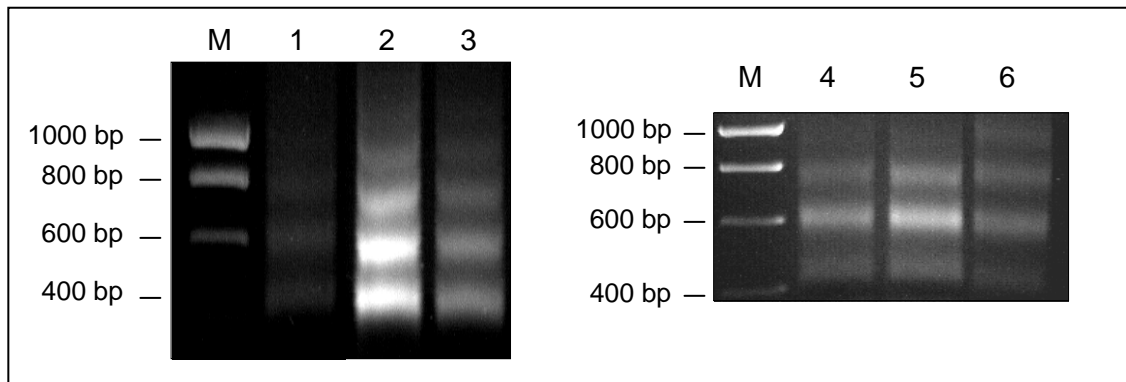


Abb. 17: Fragmentierung der DNA durch die transiente Expression von EGFP/Siva nachgewiesen mit Hilfe des „ApoAlert™ Ladder Assays“. 293-Zellen wurden für 2 Tage transfiziert, die chromosomale DNA isoliert und hinsichtlich ihrer Fragmentierung untersucht. M: DNA-Marker; Spur 1: 293-Zellen; Spur 2: EGFP/Siva-Expression; Spur 3+4: EGFP-Expression; Spur 5: EGFP/VP2-Expression; Spur 6: EGFP/VP2H310A1-Expression

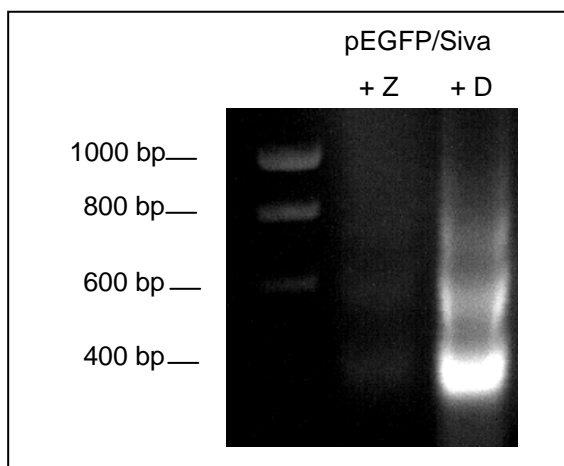


Abb. 18: Inhibierung der Siva-induzierten DNA-Fragmentierung durch den pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk. Die chromosomale DNA aus 293-Zellen, 2 Tage transfiziert mit dem Plasmid pEGFP/Siva unter Zugabe von 100 µM z-VAD-fmk, wurde mittels „ApoAlert™ Ladder Assay“ auf Fragmentierung untersucht. Z: + z-VAD-fmk; D: + DMSO

Dass die verstärkte Fragmentierung der DNA nach der Expression von EGFP/Siva durch eine Induktion der Apoptose bedingt war, wurde durch die Zugabe des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk während der transienten Transfektion nachgewiesen. Durch z-VAD-fmk werden die zentralen Mediatoren der Apoptose, die Caspasen, irreversibel inhibiert, was zu einer nahezu vollständigen Reduktion der DNA-Fragmentierung in EGFP/Siva-transfizierten Zellen führte (Abb. 18).

4.2.4. Etablierung stabiler Zelllinien zur Expression der EGFP-Fusionsproteine

Um den Einfluss der Wechselwirkung des Siva-Proteins mit dem viralen Kapsidprotein VP2 auf die Induktion der Apoptose *in vitro* weitergehend untersuchen zu können, sollten Zellkulturen etabliert werden, in denen eine stabile Expression dieser Proteine stattfand. Entsprechend transfizierte 293-Zellen wurden zu diesem Zweck durch die Zugabe von 200 µg/ml Neomycin zum Kulturmedium selektiert und weiterkultiviert. Das Vorhandensein von Siva bzw. VP2 wurde unabhängig von der Fluoreszenz des EGFP-Proteins auf RNA- und Proteinebene überprüft (Abb. 19). Zum Nachweis der mRNA-Synthese wurden Primer für die Amplifikation der kodierenden Sequenzen von EGFP, VP2 bzw. Siva verwendet. Das

die dabei detektierten Fragmente in korrekter Weise als Fusionsproteine synthetisiert wurden, zeigte die Western Blot-Analyse. Spezifische Signale für EGFP/VP2 bzw. EGFP/VP2H310A1 (58 kDa) und für EGFP/Siva (47 kDa) waren sowohl bei der Verwendung des EGFP-Antikörpers als auch bei Gebrauch der VP2- bzw. Siva-Antikörper sichtbar. Im Falle des EGFP/Siva wurden neben dieser hochmolekularen Bande kleinere Fragmente detektiert, die mit ~27 kDa die Größe des EGFP bzw. mit ~20 kDa die des Siva-Proteins besaßen und auf einen teilweisen Zerfall des Fusionsproteins in der Zelle oder während der Probenaufarbeitung schließen ließen. Im anti-VP2-Western Blot zeigten schwache Banden mit den scheinbaren Molekulargewichten von ~31, ~35 und ~37 kDa, dass auch bei EGFP/VP2- bzw. EGFP/VP2H310A1 ein geringer Anteil des Fusionsproteins abgebaut wurde.

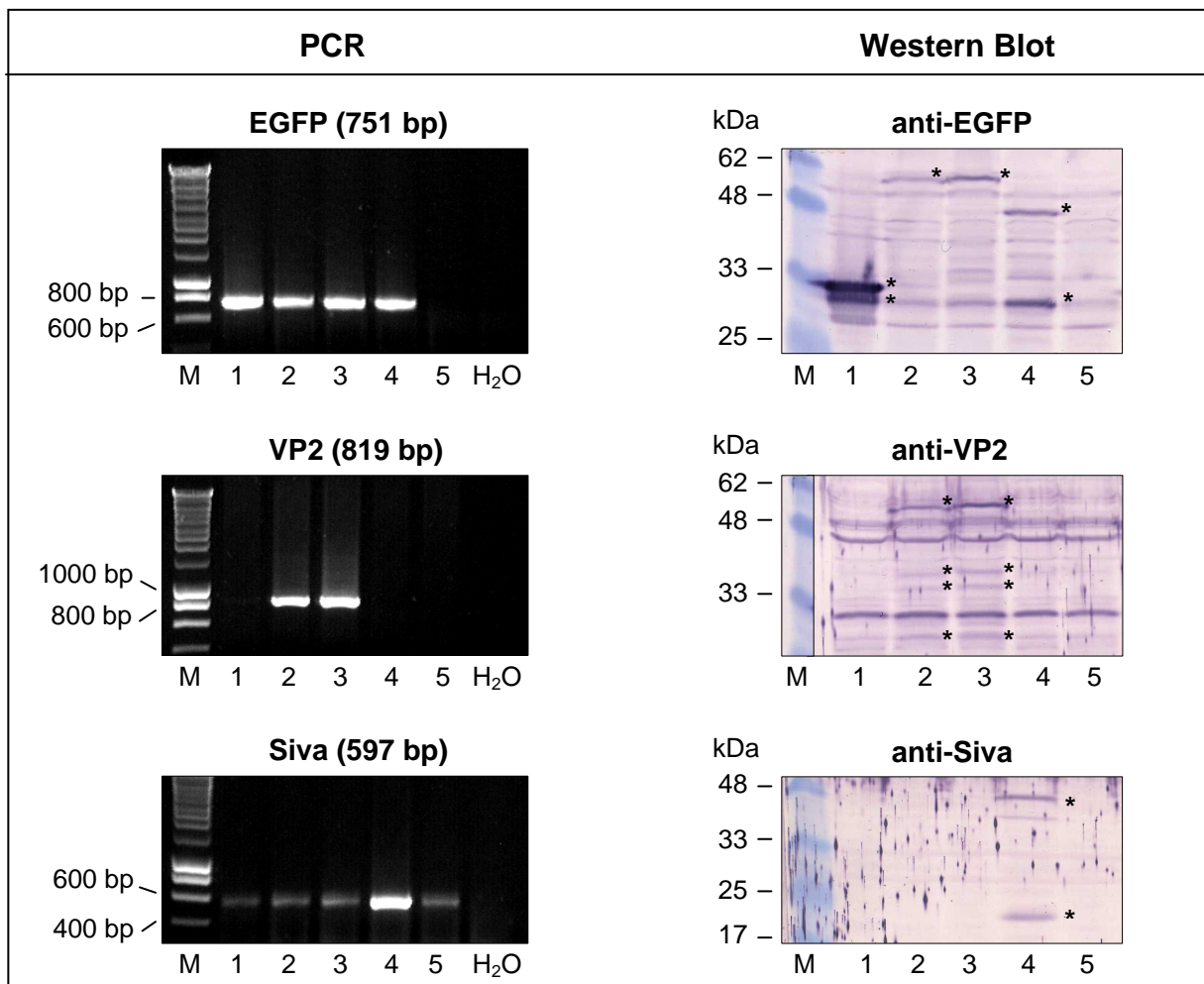


Abb. 19: Nachweis der Expression von EGFP/Siva, EGFP/VP2 und EGFP/VP2H310A1 auf RNA- und Proteinebene in stabil transfizierten 293-Zellen. Aus den Zellen wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und mittels PCR das Vorhandensein spezifischer Sequenzen für EGFP, VP2, VP2H310A1 und Siva analysiert. Für die Western Blots wurden je 80 µg Protein/Spur auf 12,5%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und die Proteine mit Hilfe der spezifischen Antikörper detektiert (*: spezifische Signale; EGFP: 27 kDa; VP2 bzw. VP2H310A1: 31 kDa; Siva: 20 kDa; EGFP/VP2 bzw. EGFP/VP2H310A1: 58 kDa; EGFP/Siva: 47 kDa). M: DNA- bzw. Proteinmarker; Spur 1: 293-EGFP-Zellen; Spur 2: 293-EGFP/VP2-Zellen; Spur 3: 293-EGFP/VP2H310A1-Zellen; Spur 4: 293-EGFP/Siva-Zellen; Spur 5: 293-Zellen; H₂O: PCR-Negativkontrolle

Die Morphologie der stabil transfizierten Zelllinien wurde mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops an fixierten Präparaten untersucht (Abb. 20-22). Während bei der stabilen Expression von EGFP, EGFP/VP2 und EGFP/VP2H310A1 keine Veränderungen der Zellmorphologie zu erkennen waren, zeigte sich, dass das im transienten System ausgeprägte heterogene Erscheinungsbild der EGFP/Siva-exprimierenden Zellen nicht mehr auftrat. Die Zellen erschienen vital, wobei das EGFP/Siva-Protein, im Gegensatz zu EGFP und den anderen Fusionsproteinen, ausschließlich im Zellkern lokalisiert war.

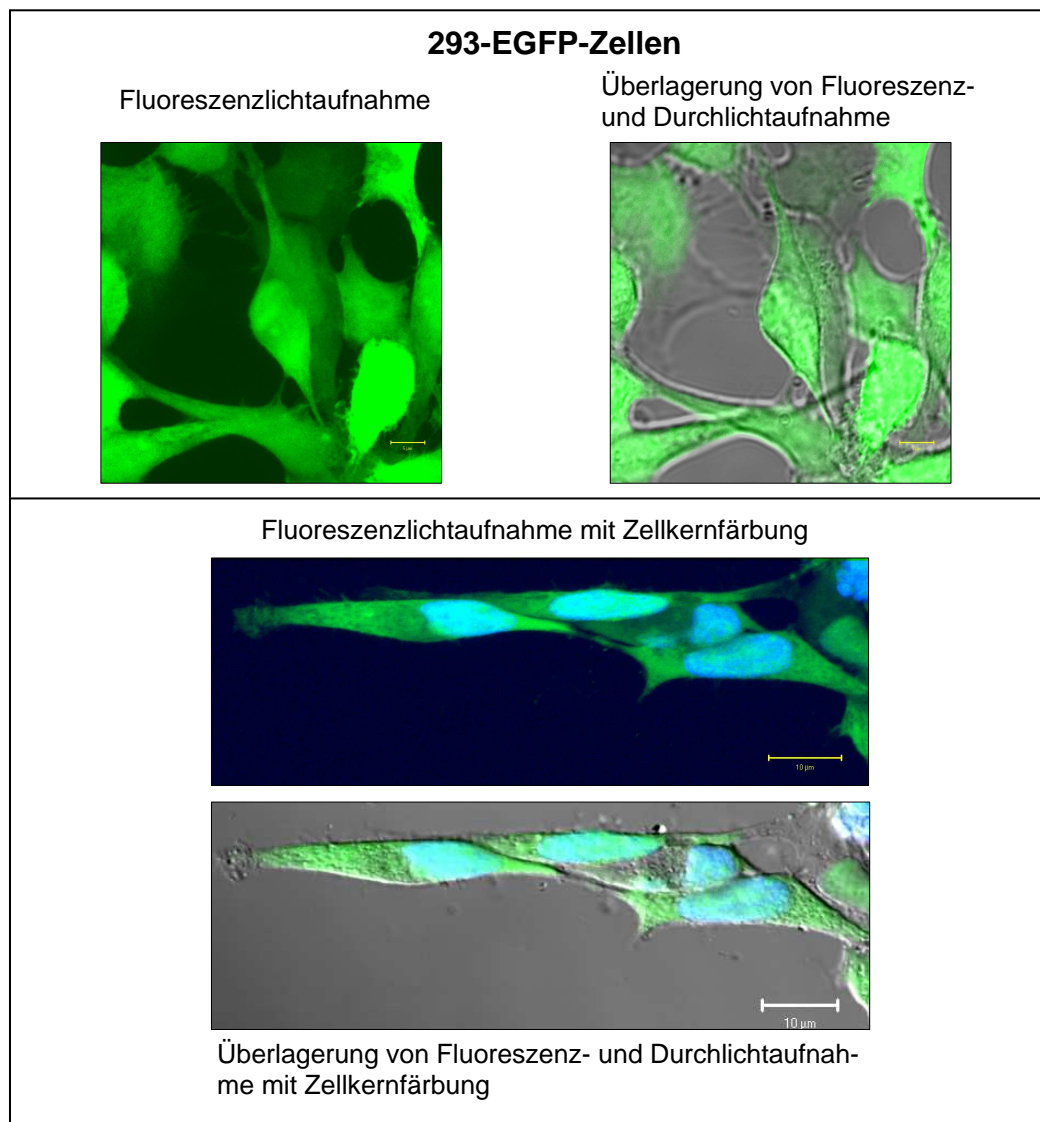


Abb. 20: Untersuchung der Zellmorphologie der stabilen Zelllinie 293-EGFP mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie. Für die Aufnahmen wurden die stabil transfizierten Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Wenn angegeben, erfolgte vor der Fixierung die Anfärbung der DNA des Zellkerns mit Hoechst-33342.

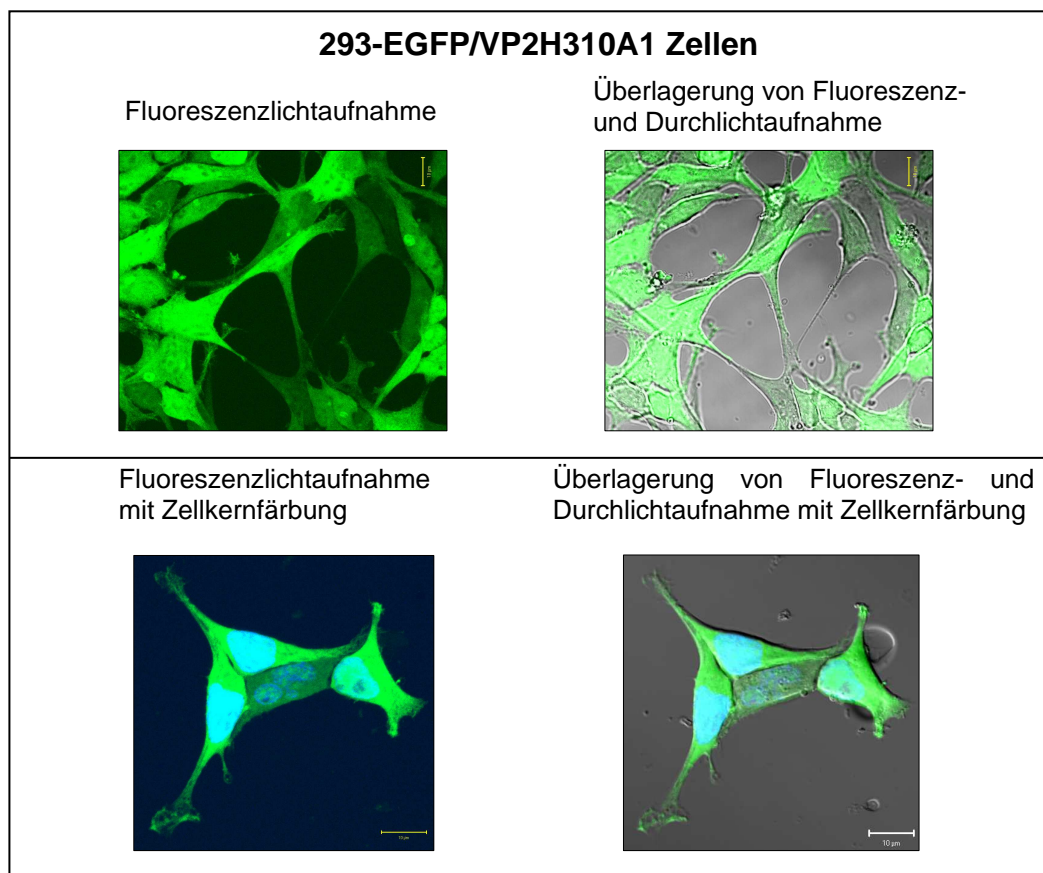
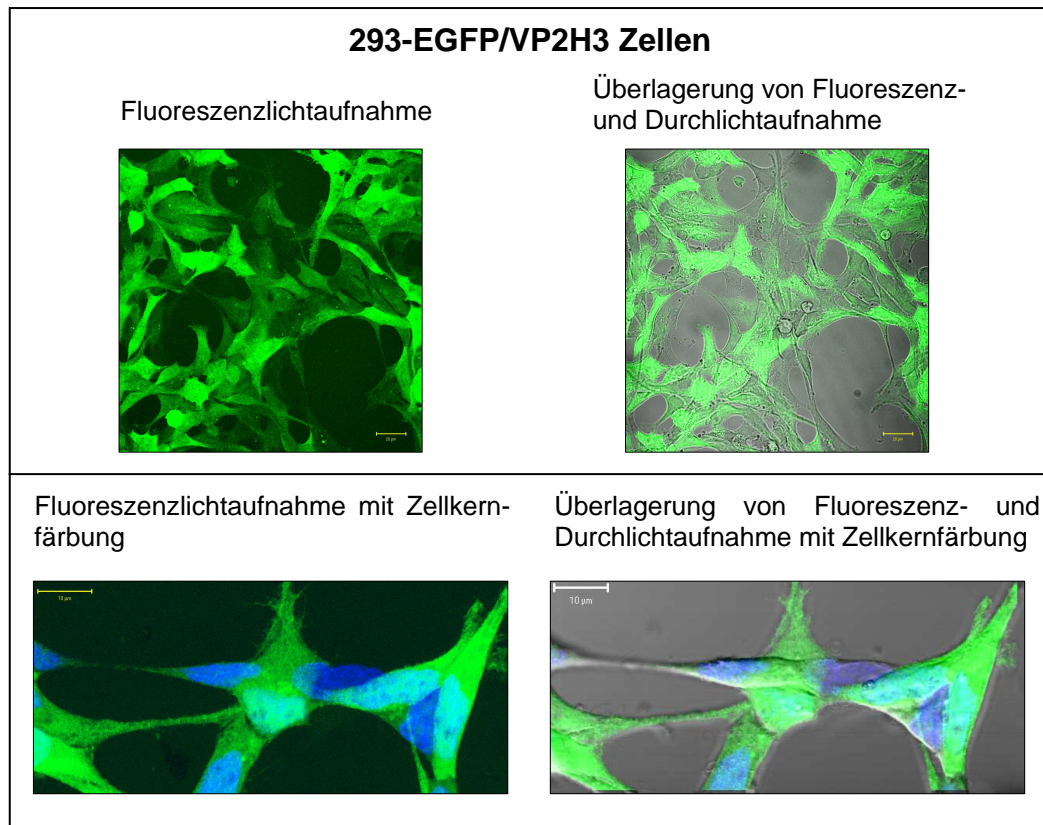


Abb. 21: Untersuchung der Zellmorphologie der stabilen Zelllinien 293-EGFP/VP2 (oben) und 293-EGFP/VP2H310A1 (unten) mittels konfokaler Laserscanning-mikroskopie. Für die Aufnahmen wurden die stabil transfizierten Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Wenn angegeben, erfolgte vor der Fixierung die Anfärbung der DNA des Zellkerns mit Hoechst-33342.

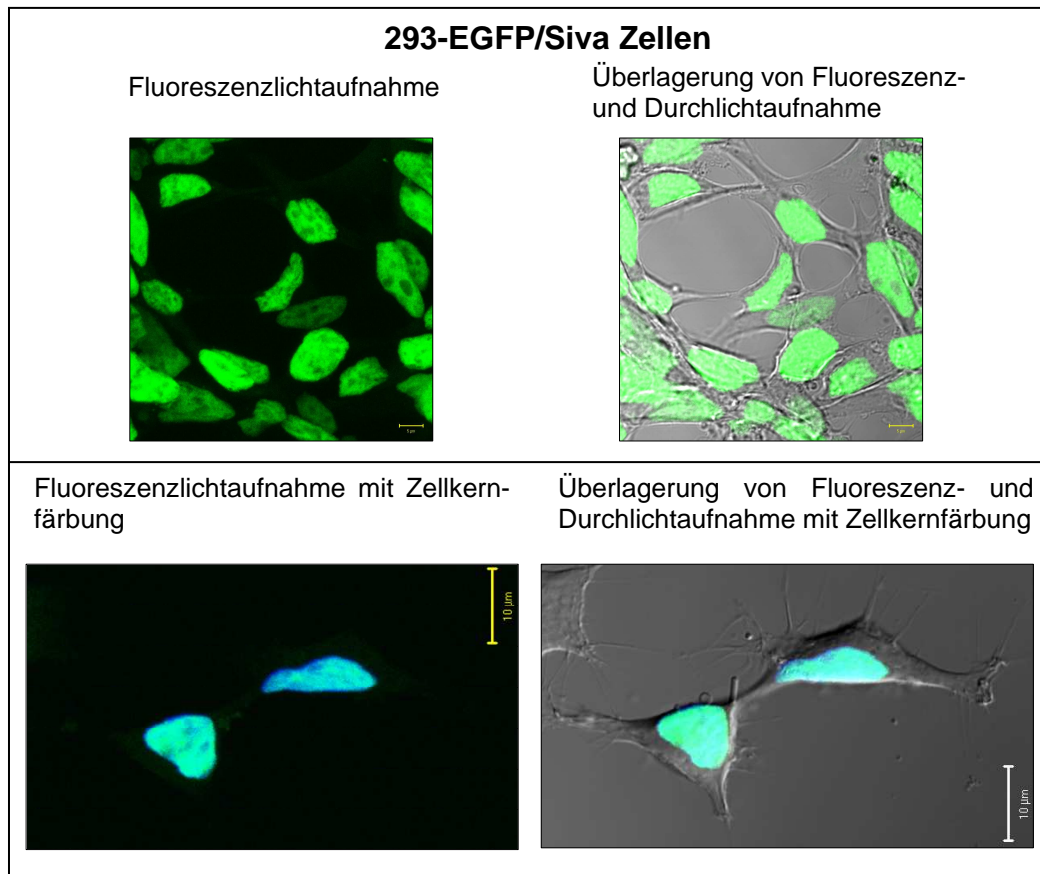


Abb. 22: Untersuchung der Zellmorphologie der stabilen Zelllinie 293-EGFP/Siva mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie. Für die Aufnahmen wurden die stabil transfizierten Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Wenn angegeben, erfolgte vor der Fixierung die Anfärbung der DNA des Zellkerns mit Hoechst-33342.

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung der verbesserten Zellvitalität war mit Hilfe des „ApoAlert™ Ladder Assays“ eine Fragmentierung der DNA durch die stabile Expression von EGFP/Siva kaum noch nachweisbar (Abb. 23A). Diese minimale DNA-Fragmentierung war auch nicht mehr durch die Zugabe des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk beeinflussbar, was darauf schließen ließ, dass in den stabil EGFP/Siva-exprimierenden Zellen eine Adaption erfolgte, die die Apoptose-induzierende Wirkung von Siva verhinderte.

Bei der Analyse der DNA-Fragmentierung in 293-EGFP/VP2 bzw. 293-EGFP/VP2H310A1 Zellen konnte gezeigt werden, dass bei stabiler Expression dieser Fusionsproteine ein deutlich verstärkter Abbau der chromosomalen DNA bei Expression der EGFP/VP2-Variante auftrat, während dies im Falle des EGFP/VP2H310A1-Proteins nicht zu beobachten war (Abb. 23B). Dieses Ergebnis wurde bei der Verwendung von frisch etablierten (ca. 4 Wochen alten) Zellkulturen erhalten und konnte nicht an länger kultivierten Zellen reproduziert werden (nicht dargestellt), ein Hinweis darauf, dass sich auch diese Zellen adaptierten, was dem Apoptose-induzierenden Effekt entgegenwirkte.

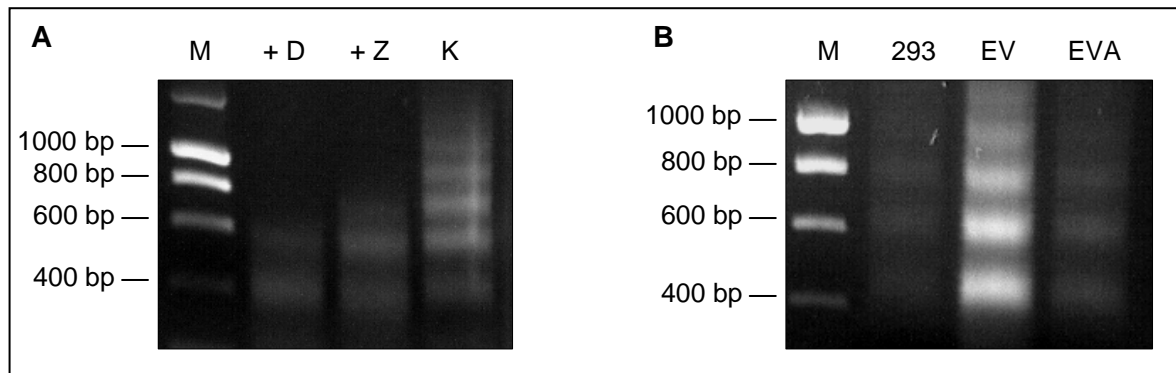


Abb. 23A: Keine Fragmentierung der DNA bei stabiler EGFP/Siva-Expression in 293-Zellen. Stabile 293-EGFP/Siva-Zellen wurden für 24 h mit z-VAD-fmk (65 μ M) bzw. DMSO kultiviert, die chromosomale DNA isoliert und mittels „ApoAlert™ Ladder Assay“ hinsichtlich ihrer Fragmentierung untersucht. M: DNA-Marker; D: DMSO; Z: z-VAD-fmk; K: Positivkontrolle für den „ApoAlert™ Ladder Assay“

Abb. 23B: Fragmentierung der DNA bei stabiler EGFP/VP2-Expression in 293-Zellen. Die chromosomale DNA stabiler 293-EGFP/VP2- bzw. 293-EGFP/VP2H310A1-Zellen (ca. 4 Wochen kultiviert, ~70% konfluent) wurde mittels „ApoAlert™ Ladder Assay“ hinsichtlich ihrer Fragmentierung untersucht. M: DNA-Marker; 293: nicht transfizierte Zellen; EV: 293-EGFP/VP2-Zellen; EVA: 293-EGFP/VP2H310A1-Zellen

Auch die Kontrolle der Teilungsraten der stabil transfizierten Zelllinien erbrachte keinen Hinweis auf eine beeinträchtigende Wirkung der Expression der Fusionsproteine (Abb. 24).

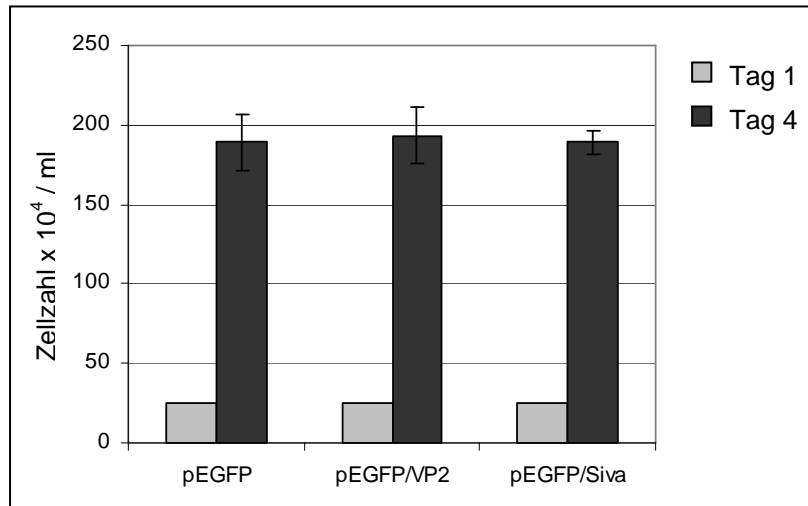


Abb. 24: Kein Einfluss der stabilen Expression von EGFP, EGFP/VP2 und EGFP/Siva auf die Teilungsrate von 293-Zellen. Jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml, stabil transfiziert mit den Plasmiden pEGFP, pEGFP/VP2 bzw. pEGFP/Siva, wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und nach 4 Tagen die Zellzahlen bestimmt (Dreifachbestimmung).

4.2.5. Transiente Doppeltransfektion von Siva- und VP2-kodierenden Plasmiden

Da bei einer stabilen Expression der EGFP-Fusionsproteine keine anhaltende Apoptose-induzierende Wirkung von EGFP/Siva oder EGFP/VP2 erreicht werden konnte, sollte versucht werden, durch transiente Doppeltransfektionen, Effekte einer Interaktion zwischen Siva und VP2 nachzuweisen. Dazu standen zwei weitere, Siva-kodierende Vektoren zur

Verfügung. Zum einen das pcDNA3/Siva-Plasmid, das die konstitutive Expression von Siva ermöglicht. Zum anderen wurde ein pRedStar/Siva-Konstrukt hergestellt, das für ein Fusionsprotein aus dem rot fluoreszierenden RedStar-Protein und Siva kodiert und somit über die Fluoreszenzmikroskopie eine schnelle und einfache Überprüfung der Expression beider Interaktionspartner erlaubte. Abbildung 25 zeigt ein Beispiel für eine transiente Transfektion von pRedStar/Siva und pEGFP/VP2 in 293-Zellen.

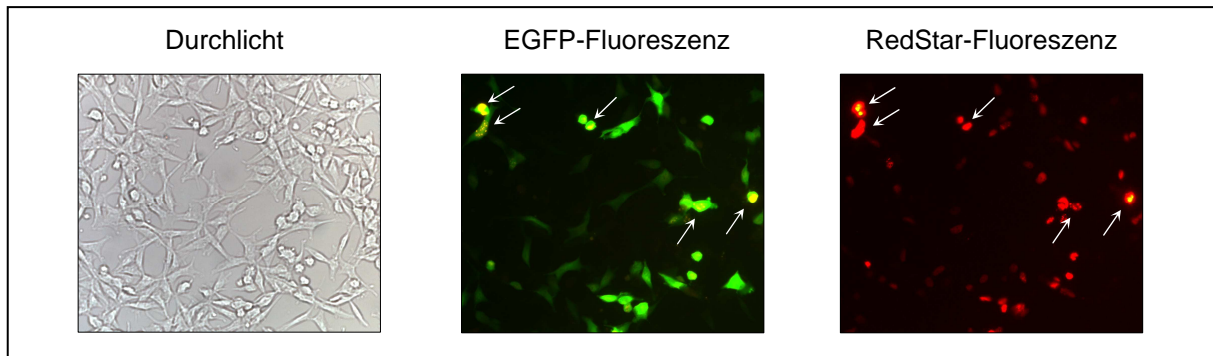


Abb. 25: Expression von EGFP/VP2 und RedStar/Siva nach Doppeltransfektion von 293-Zellen. 293 Zellen wurden für 2 Tage transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Weiße Pfeile zeigen Beispiele doppelt transfizierter Zellen. Vergrößerung: 200x

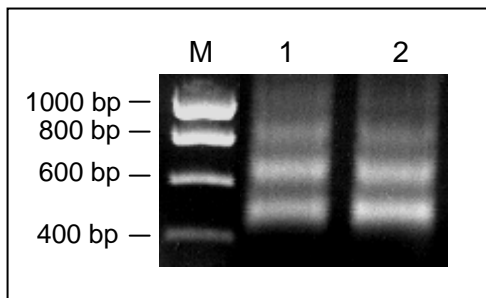


Abb. 26: Keine verstärkte Fragmentierung chromosomaler DNA durch transiente Doppeltransfektion von pcDNA3/Siva und pEGFP/VP2. 293-Zellen wurden für 2 Tage transfiziert und die chromosomale DNA mittels „ApoAlert™ Ladder Assay“ untersucht. M: DNA-Marker; Spur 1: Expression von Siva und VP2; Spur 2: Expression von Siva

Sowohl 293-Zellen, doppelt transfiziert mit pRedStar/Siva und pEGFP/VP2, als auch solche mit pcDNA3/Siva und pEGFP/VP2 wurden mit dem „ApoAlert™ Ladder Assay“ auf die Fragmentierung chromosomaler DNA untersucht. In keinem Falle konnte eine, gegenüber der alleinigen Expression von RedStar/Siva bzw. Siva, gesteigerte Fragmentierung der DNA detektiert werden (exemplarisch dargestellt in Abb. 26). Mit Hilfe dieser sensitiven Nachweismethode war es daher nicht möglich, Auswirkungen einer transienten Expression der Interaktionspartner Siva und VP2 auf die Induktion der Apoptose nachzuweisen.

4.3. Untersuchung der Induktion apoptotischer Prozesse durch CVB3H3 und CVB3H310A1 *in vitro*

4.3.1. Kondensierung und Fragmentierung des Chromatins

Durch die Schwierigkeiten bei der rekombinanten Expression des viralen Kapsidproteins VP2 (bzw. VP2H310A1) und dessen humanen Interaktionspartners Siva war keine eingehendere Untersuchung der Beeinflussung apoptotischer Prozesse möglich. Daher wurde für die weitere Charakterisierung der Apoptose-Induktion das intakte Virus CVB3H3 (bzw. CVB3H310A1) verwendet. Die Anfärbung der DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst-33342 zeigt, dass es im Verlauf der Infektion mit CVB3H3 zu einer zunehmenden Kondensierung des Chromatins kam (Abb. 27).

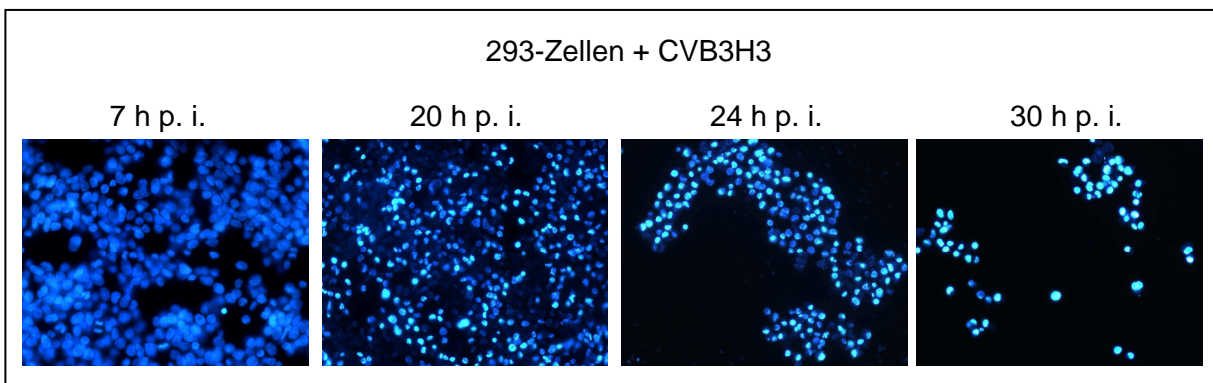


Abb. 27: Zunahme der Chromatin-Kondensierung im zeitlichen Verlauf der CVB3H3-Infektion. 293-Zellen wurden infiziert (m.o.i. 2,5) und die DNA zu den angegebenen Zeiten mit Hoechst-33342 angefärbt. Vergrößerung: 400x

Abbildung 28 zeigt, dass die unterschiedliche Fähigkeit von CVB3H3 und CVB3H310A1 zur Auslösung der Apoptose *in vivo* auch unter *in vitro*-Bedingungen nachweisbar ist. Obwohl bei

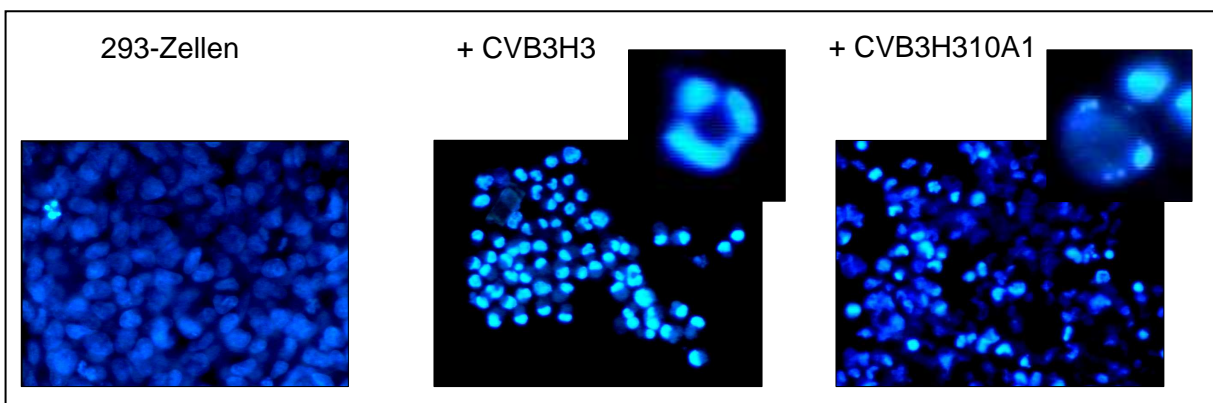


Abb. 28: Nachweis einer stärkeren Kondensierung des Chromatins 26 h nach Infektion (m.o.i. 10) von 293-Zellen mit CVB3H3 im Vergleich zu CVB3H310A1. Die Anfärbung des Chromatins erfolgte mittels Hoechst-33342. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen Zellkerne mit fragmentiertem Chromatin. Vergrößerung: 630x

beiden Virustypen 26 h p. i. eine Fragmentierung einzelner Zellkerne beobachtet werden konnte, traten Unterschiede hinsichtlich der Chromatin-Kondensierung auf. Während in CVB3H3-infizierten Zellen das Chromatin 26 h p. i. in 90-95% der Zellen stark kondensiert vorlag, war dies bei Infektion mit CVB3H310A1 zu diesem Zeitpunkt noch deutlich weniger stark ausgeprägt. Nur 20-30% zeigten den hohen Grad der Chromatin-Kondensierung, während die Mehrzahl der Zellkerne nur leicht kondensiertes Chromatin besaß.

Diese Unterschiede in der nukleären Morphologie zwischen CVB3H3- und CVB3H310A1-

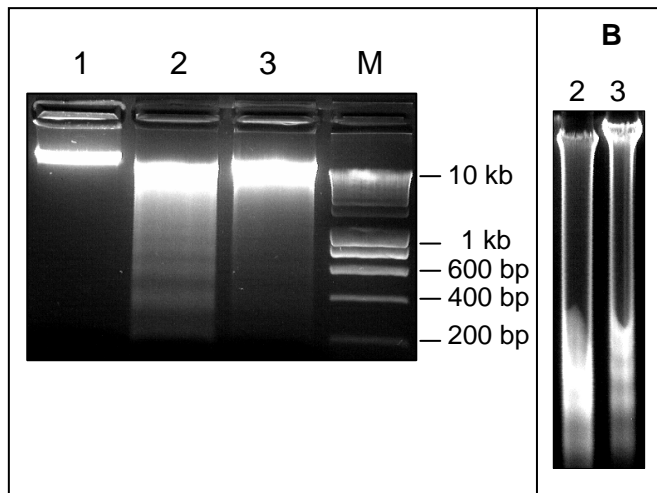


Abb. 29: Nachweis der Fragmentierung chromosomaler DNA von 293-Zellen 34 h nach Infektion mit CVB3H3, jedoch nicht mit CVB3H310A1 (m.o.i. 2,5). Ausschnitt B zeigt fragmentierte DNA auch bei CVB3H310A1-Infektion 40 h p. i.

Spur 1: 293-Zellen

Spur 2: + CVB3H3

Spur 3: + CVB3H310A1

M: DNA-Größenmarker

infizierten Zellen waren auch bei der Analyse der DNA-Fragmentierung erkennbar (Abb. 29). Die während der Apoptose auftretende „DNA-Leiter“-ähnliche Spaltung der chromosomalen DNA in Oligomere von ~180 bp war in CVB3H3-infizierten Zellen deutlich zu erkennen. Obwohl, verglichen mit Kontrollzellen, die Infektion mit CVB3H310A1 auch zu einer Reduktion der Größe der hochmolekularen chromosomalen DNA führte, war eine DNA-Fragmentierung zu diesem Zeitpunkt noch nicht sichtbar, sondern trat verzögert auf.

4.3.2. Induktion der Caspase-3-Aktivität

Im Verlauf der Apoptose führt die Aktivierung verschiedener Caspasen zur spezifischen Spaltung vieler zellulärer Proteine, wobei die Caspase-3 eine zentrale Rolle einnimmt. Ihre Aktivierung während einer Infektion mit CVB3H3 bzw. CVB3H310A1 wurde mithilfe eines colorimetrischen Tests unter Verwendung des Substrats DEVD-pNA untersucht. 293-Zellen wurden mit Virus infiziert (m.o.i. 10), Proben zu den angegebenen Zeiten entnommen und auf das Vorhandensein von Caspase-3-Aktivität untersucht. Abbildung 30 zeigt, dass eine Infektion mit beiden Viren im gleichen Maße zu einer Aktivierung der Caspase-3 führte, wobei jedoch der zeitliche Verlauf im Fall des CVB3H310A1-Virus verzögert war.

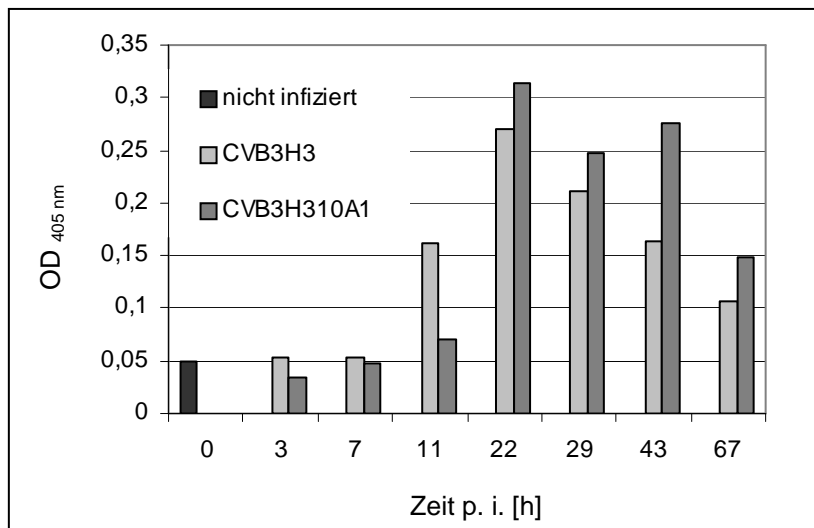


Abb. 30: Nachweis der Caspase-3-Aktivität nach Infektion von 293-Zellen mit CVB3H3 bzw. CVB3H310A1 (m.o.i. 10). Die Probenahme für den colorimetrischen Caspase-3-Assay erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten.

Der Nachweis einer Aktivierung der Caspase-3 erfolgte auch mittels Western Blot, wo zum einen die Intensitätsabnahme der pro-Caspase-3-entsprechenden Bande (32 kDa) im Infektionsverlauf auf deren proteolytische Aktivierung hindeutete (Abb. 31A). Zum anderen war die Prozessierung des Substrats poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP), eines nukleären Proteins mit Funktion in DNA-Reparaturprozessen nachweisbar. Die Spaltung der PARP (116 kDa) im Verlauf der Apoptose durch die Caspase-3 konnte durch das Auftreten des 85 kDa-Fragments nachgewiesen werden (Abb. 31B). Auch war zu sehen, dass die Spaltung der PARP bei Infektion mit beiden Virustypen auftritt, wobei sie aber in CVB3H3-infizierten Zellen früher beginnt als bei Infektion mit CVB3H310A1 (11 h p. i.).

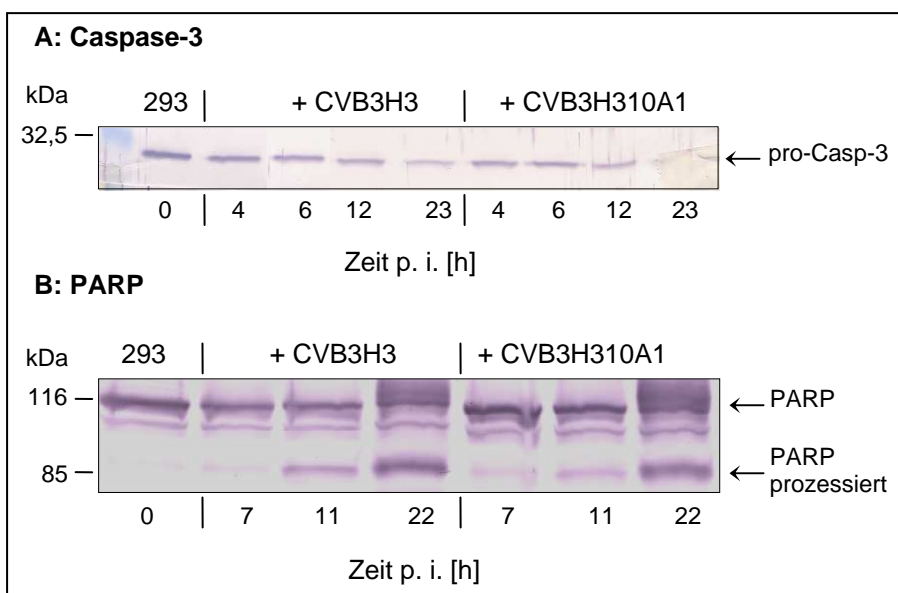


Abb. 31: Nachweis der Prozessierung von pro-Caspase-3 (A) und PARP (B) nach Infektion von 293-Zellen mit CVB3H3 bzw. CVB3H310A1 (m.o.i. 10) mittels Western Blot. Je 40 µg Protein wurden auf einem 10%-igen (A) bzw. 7,5%-igen (B) SDS-PAA-Gel analysiert.

4.3.3. Induktion anderer Caspase-Aktivitäten

Um zu bestimmen, welche der Initiator-Caspasen verantwortlich für die Aktivierung der Caspase-3 im Verlauf einer CVB3-Infektion ist, wurden colorimetrische Tests durchgeführt

und die Substrate für die Caspase-8 (IETD-pNA) und Caspase-9 (LEHD-pNA) verwendet. Mit Hilfe dieser Tests konnte keine, der Caspase-3 zeitlich vorausgehende, Aktivität dieser Caspasen detektiert werden, wie Abbildung 32 exemplarisch zeigt. Auch bei der Verwendung eines sensitiveren, luminometrischen Testsystems war keine Aktivität dieser beiden Initiator-Caspasen erkennbar (Abb. 33).

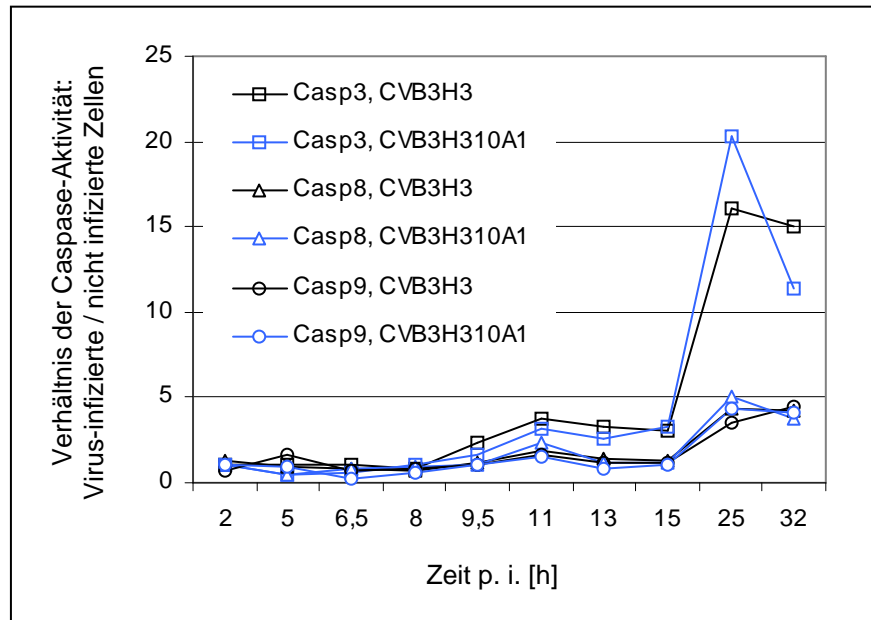


Abb. 32: Fehlender Nachweis einer initialen Aktivität der Caspase-8 oder Caspase-9 nach Virusinfektion mittels colorimetrischer Tests. GMK-Zellen wurden mit CVB3H3 bzw. CVB3H310A1 infiziert (m.o.i. 2,5), zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen und jeweils 30 µg Protein auf das Vorhandensein spezifischer Caspase-Aktivitäten untersucht.

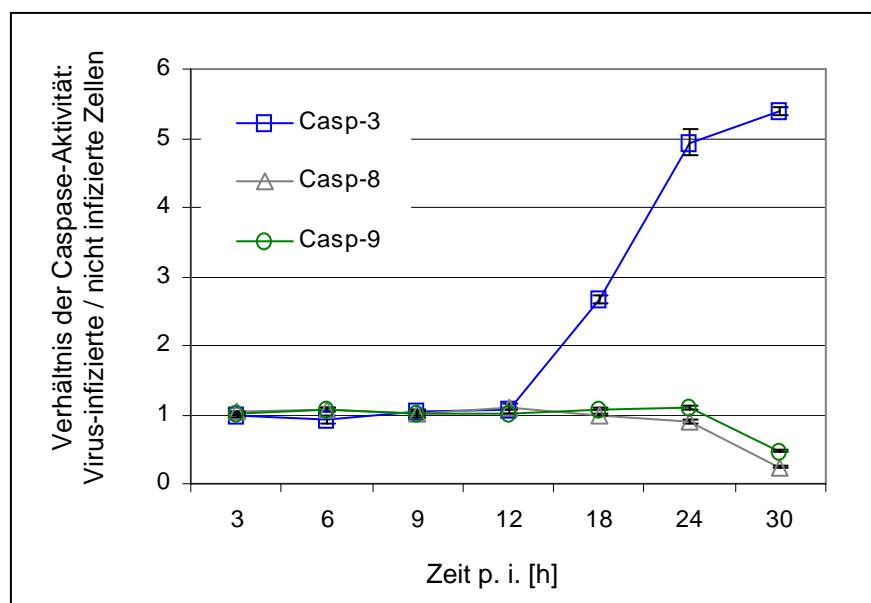


Abb. 33: Fehlender Nachweis einer Aktivität von Caspase-8 oder Caspase-9 nach Virusinfektion mittels luminometrischer Tests. GMK-Zellen wurden mit CVB3H3 für die angegebene Zeitdauer infiziert (m.o.i. 2,5) und die Caspase-Aktivitäten in den Zelllysaten bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD aus jeweils 3 Proben/Zeitpunkt.

Durch den direkten Nachweis dieser Caspasen mittels Western Blot konnte jedoch deren Prozessierung in GMK-Zellen im Verlauf einer CVB3H3-Infektion nachgewiesen werden. Mit fortschreitender Infektionsdauer war eine Abnahme der inaktiven Proform beider Caspasen bei gleichzeitigem Auftreten von Spaltprodukten zu beobachten (Abb. 34). Für die pro-Caspase-8 (55 kDa) sind im Verlauf der Enzymreifung zum aktiven Heterodimer (mit Untereinheiten von 18 und 10 kDa) Zwischenprodukte mit 43 kDa und 26 kDa bekannt. Diese intermediären Fragmente waren auch während der CVB3H3-Infektion ab 3 h p. i. nachweisbar. Zusätzlich wurde ein prozessiertes Fragment von ~33 kDa detektiert. Im Falle der pro-Caspase-9 (46 kDa) führt die Reifung zur aktiven Form (18 und 10 kDa) über ein 35 kDa-Zwischenprodukt. Dieses war, ebenso wie das 18 kDa-Fragment, ebenfalls bereits 3 h nach Infektion mit CVB3H3 detektierbar. Auch hier traten neben den spezifischen Spaltprodukten während der Caspase-Aktivierung weitere Fragmente von ~33 und ~27 kDa auf.

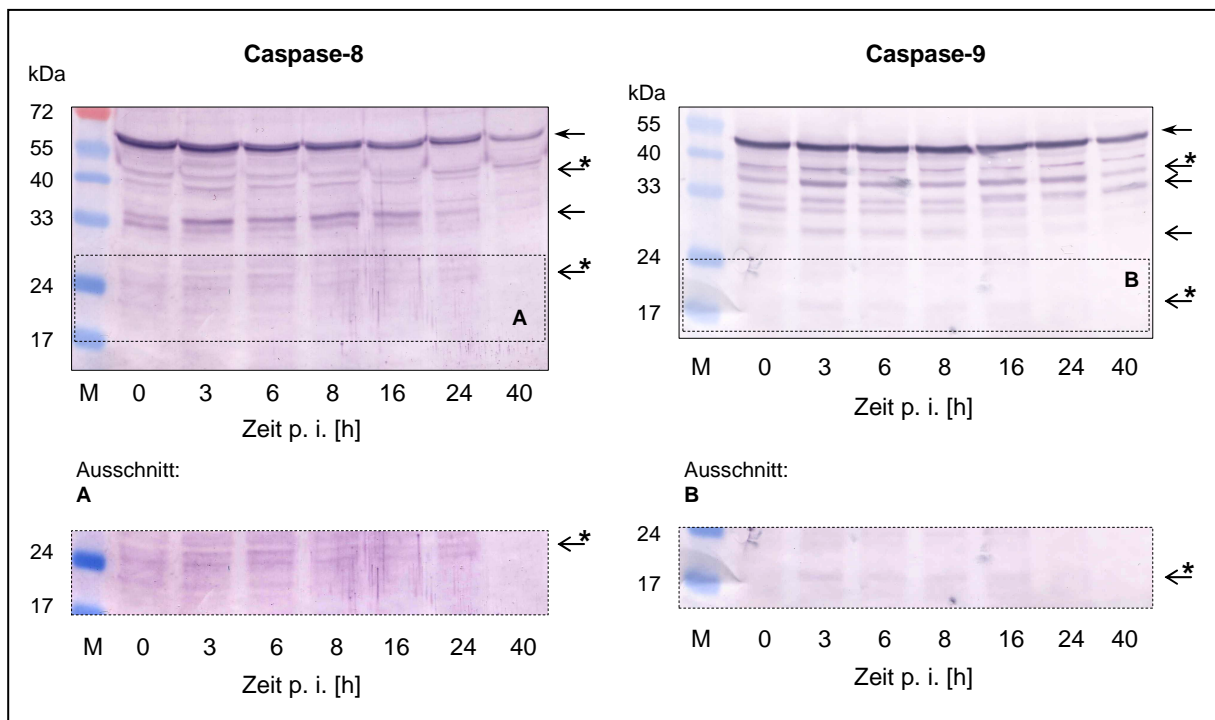


Abb. 34: Nachweis der Prozessierung der Caspasen-8 und -9 nach Infektion von GMK-Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 2,5) mittels Western Blot. Es wurden je 70 µg Protein auf 10%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt. A + B: Ausschnitte mit erhöhtem Kontrast (Markierung der pro-Caspasen mit ←, der Spaltprodukte mit ←, spezifischer Fragmente im Verlauf der Reifung der Enzyme mit *)

Um zu klären, warum trotz der Prozessierung der pro-Caspasen nicht deren Aktivität in den colorimetrischen und luminometrischen Testsystemen nachweisbar war, wurde die Aktivierung dieser Enzyme in Jurkat-Zellen untersucht, die zum einen mit Apoptose-induzierenden Substanzen behandelt oder aber mit CVB3H3 infiziert wurden. Diese Zellen werden häufig als Positivkontrolle bei der Analyse apoptotischer Prozesse eingesetzt sowohl bei der Rezeptor-vermittelten Aktivierung des extrinsischen Apoptosewegs als auch bei

Verwendung intrinsisch wirkender Agenzien. Abbildung 35 zeigt, dass Jurkat-Zellen mit CVB3H3 infizierbar sind. Die Expression des grün fluoreszierenden Proteins war nach Infektion mit dem rekombinanten Virus CVB3H3/EGFP deutlich erkennbar. Auch eine zunehmende Synthese des viralen Kapsidproteins VP2 wurde mit Hilfe des Western Blots nachgewiesen.

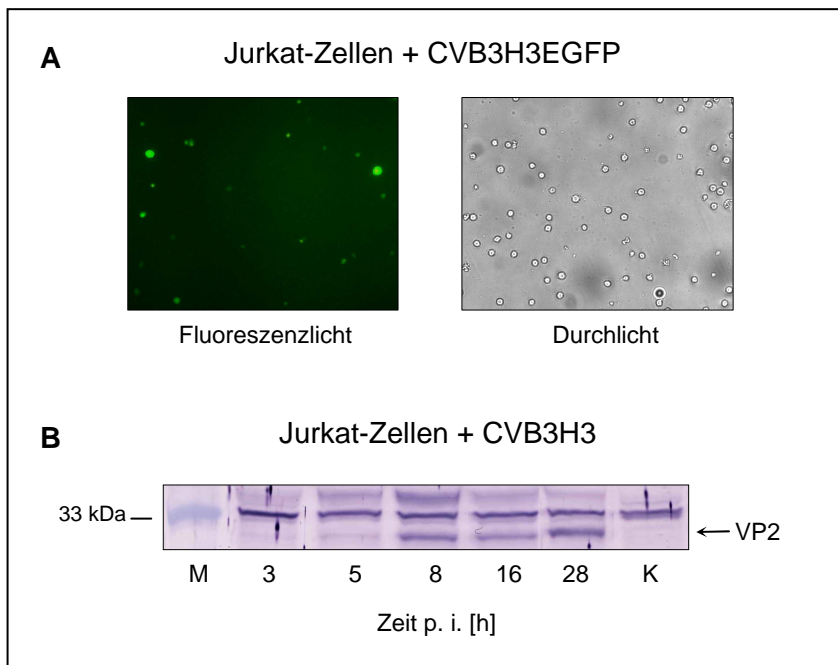


Abb. 35: Nachweis der Infizierbarkeit von Jurkat-Zellen mit CVB3.

A: EGFP-Expression nach Infektion von Jurkat-Zellen mit dem rekombinanten Virus CVB3H3/EGFP. Die mikroskopische Analyse erfolgte 11 h nach Infektion der Zellen (m.o.i. 2,5).

B: Expression des viralen Kapsidproteins VP2 nach Infektion von Jurkat-Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 2,5). Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot je 100 µg Protein auf einem 12,5%-igen SDS-PAA-Gel analysiert. (K: nicht infiziert)

Die durch die CVB3H3-Infektion bedingte Prozessierung der pro-Caspase-8 bzw. -9 in Jurkat-Zellen ähnelte der bereits in GMK-Zellen beobachteten. Es traten neben spezifischen, während der proteolytischen Reifung entstehenden Fragmenten auch zusätzliche Spaltprodukte mit ~35 und ~38 kDa (Casp-8) bzw. ~33 kDa (Casp-9) auf, die ab 8 h p. i. nachweisbar waren (Abb. 36A). Beim Vergleich dieses Virus-induzierten Prozessierungsmusters der Caspasen mit dem eines etablierten Apoptose-Induktors fällt die hohe Übereinstimmung auf (Abb. 36B). Camptothecin dient aufgrund seiner inhibierenden Wirkung auf die DNA-Topoisomerase I häufig als positive Kontrolle bei Apoptose-Untersuchungen und wurde auch seitens des Herstellers bei der Überprüfung der Spezifität seiner Caspase-3 und -9 Antikörper (Epitomics®) verwendet. Nach Camptothecin-Behandlung wurden die gleichen spezifischen Reifungsprodukte wie nach der CVB3H3-Infektion detektiert – ein 26 kDa-Caspase-8-Fragment, das 35 kDa-Caspase-9-Fragment sowie die aktive 17 kDa Untereinheit der Caspase-3. Auch die zwei zusätzlichen Fragmente der Caspase-8 von ~35 und ~38 kDa waren nachweisbar.

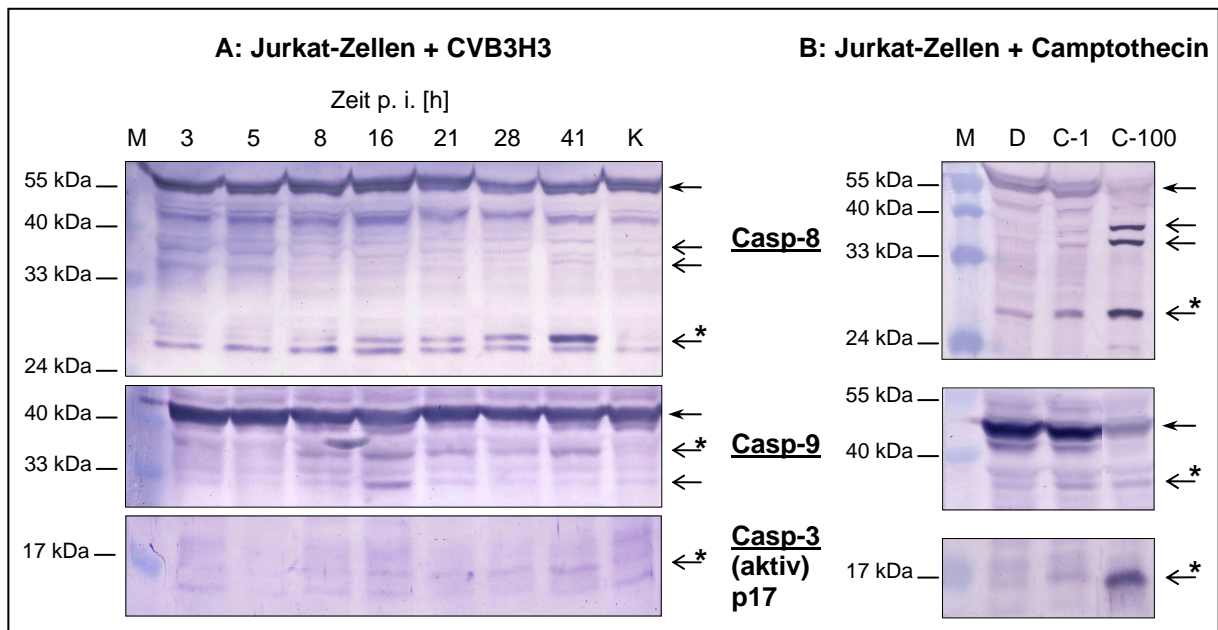


Abb. 36: Nachweis der Prozessierung der pro-Caspasen-8, -9 und -3 in Jurkat-Zellen nach Infektion mit CVB3H3 bzw. nach Zugabe von Camptothecin mittels Western Blot. A: Die Zellen wurden infiziert (m.o.i. 2,5) und zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen. Die Auftrennung von je 100 µg Protein erfolgte auf 10%-igen [bzw. 12,5%-igen (Casp-3)] SDS-PAA-Gelen. (K: nicht infiziert)

B: Die Zellen wurden für 24 h mit DMSO bzw. Camptothecin versetzt und die Extrakte auf 10%-igen [bzw. 12,5%-igen (Casp-3)] SDS-PAA-Gelen aufgetrennt (80 µg Protein/Spur). „D“: DMSO; „C-1“: 0,01 µM Camptothecin; „C-100“: 1 µM Camptothecin (Markierung der pro-Caspasen mit ←, der Spaltprodukte mit ←, spezifischer Fragmente im Verlauf der Reifung der Enzyme mit *)

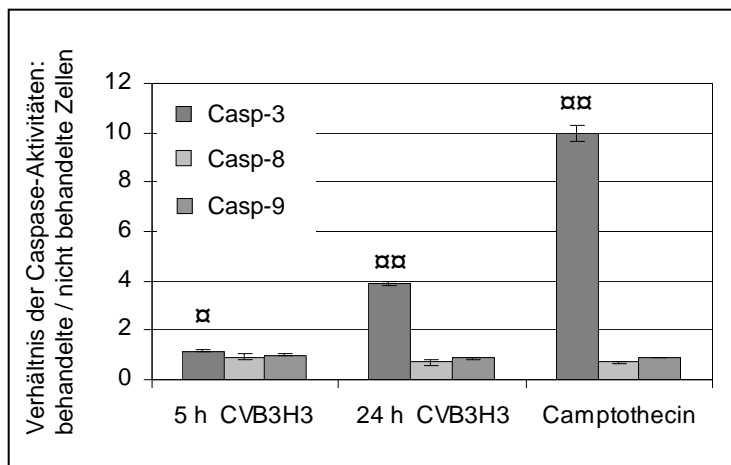


Abb. 37: Fehlender Nachweis einer Aktivität von Caspase-8 oder Caspase-9 in Jurkat-Zellen sowohl nach CVB3H3-Infektion als auch nach Camptothecin-Behandlung. Jurkat-Zellen wurden für 5 h bzw. 24 h mit CVB3H3 infiziert (m.o.i. 2,5) oder für 24 h mit Camptothecin (0,1 µM) versetzt und die Caspase-Aktivitäten in den Zelllysaten mittels luminometrischer Tests bestimmt. Dargestellt sind die MW ± SD aus jeweils 3 Proben. (α: $P < 0,05$; αα: $P < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle im Student'schen t-Test)

Die Überprüfung der Aktivität der prozessierten Caspase-Formen in Jurkat-Zellen erfolgte unter Verwendung des luminometrischen Testsystems. Doch auch hier wurden, ähnlich wie in GMK- und 293-Zellen, trotz nachweisbarer Caspase-3-Aktivität keine spezifischen Caspase-8- und -9-Aktivitäten gemessen (Abb. 37). Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde eine weitere Kontrolle verwendet, bei der die Induktion der Apoptose in Jurkat-Zellen

durch die Zugabe von anti-Fas-Antikörpern stimuliert wurde, wodurch der Rezeptor-

vermittelte extrinsische Apoptoseweg aktiviert wird. Abbildung 38 stellt die Ergebnisse der Western Blot-Analyse und des luminometrischen Aktivitätstests dar. Auch die Apoptose-induzierenden Signale über den Fas-Rezeptor führten zu einer Intensitätsabnahme der den pro-Caspasen-entsprechenden Banden, verbunden mit der gleichzeitigen Detektion der bereits beobachteten spezifischen Prozessierungsprodukte der Caspasen-8 (26 kDa) und -9 (35 kDa). Auch das während der proteolytischen Reifung der Caspase-3 zu erwartende Fragment (17 kDa) wurde detektiert (Abb. 38A). Wie schon bei Camptothecin-Behandlung bzw. CVB3H3-Infektion traten noch zusätzliche Spaltprodukte auf (~35 kDa Fragment [Casp-8]; ~33 kDa Fragment [Casp-9]; sowie ein weiteres Fragment der Caspase-9 mit ~26 kDa). Ein entsprechender Caspase-Aktivitätstest zeigte wiederum nur eine schwach erhöhte Spaltung der spezifischen Caspase-Substrate in den behandelten Jurkat Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abb. 38B). Eine Ursache dafür könnte in der Funktion der Caspase-8 und -9 begründet sein. Als Initiator-Caspasen werden sie nur transient aktiviert und auch das Ausmaß ihrer Aktivierung ist geringer als das der Caspase-3. Deren Wirkung als Effektor-Caspase, die für die Spaltung zahlreicher zellulärer Substrate verantwortlich ist, erfordert eine langanhaltendere und ausgeprägtere Aktivität als die regulierenden Funktionen der Caspase-8 und -9 zu Beginn der proteolytischen Kaskade. Die mit Hilfe des Western Blots nachgewiesenen Prozessierungen der Initiator-Caspase-8 und -9, die in CVB3H3-infizierten Zellen vergleichbar mit den Positivkontrollen waren, wiesen auf ihre Beteiligung

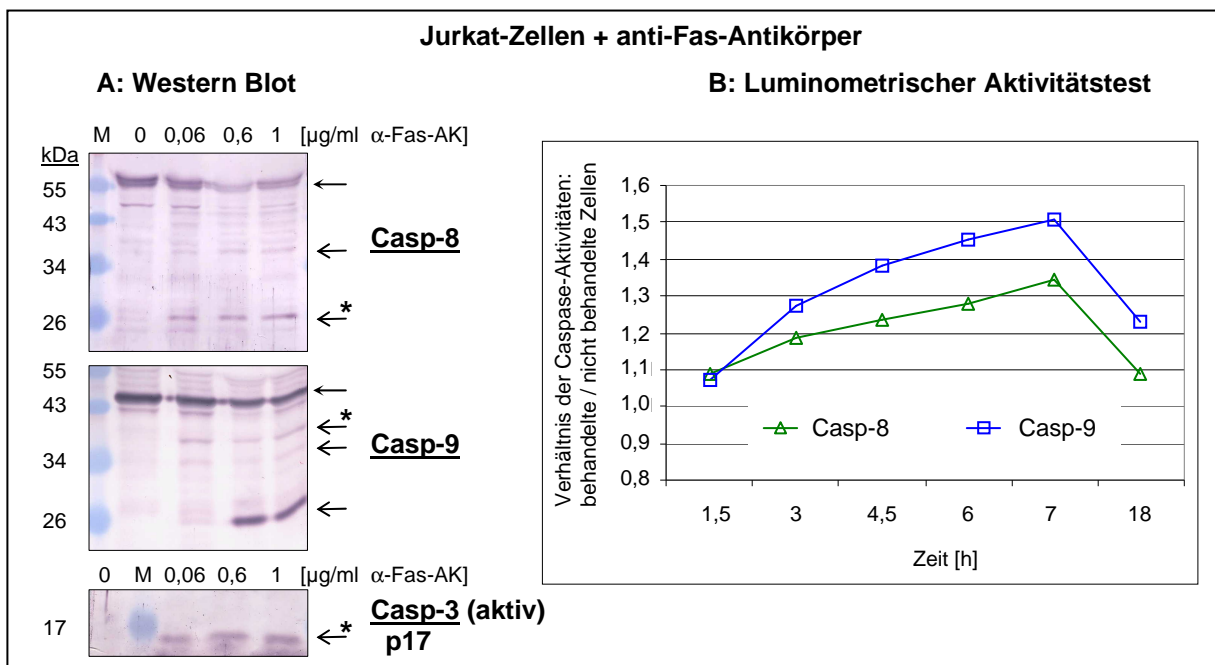


Abb. 38: Prozessierung der pro-Caspasen-8, -9 und -3 in Jurkat-Zellen nach Zugabe von anti-Fas-Antikörpern mittels Western Blot (A) und Überprüfung ihrer Aktivität im luminometrischen Test (B).

A: Je 5×10^5 Zellen/ml wurden für 18 h mit anti-Fas-Antikörpern in den angegebenen Konzentrationen versetzt und 60 µg Protein/Spur auf einem 10%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt.

Markierung der pro-Caspasen mit ←, der Spaltprodukte mit ←*, spezifischer Fragmente im Verlauf der Reifung der Enzyme mit *

B: Je 5×10^4 Zellen/ml wurden mit anti-Fas-Antikörpern (1 µg/ml) versetzt und zu den angegebenen Zeiten die Caspase-8 und -9-Aktivität in den Zellysaten bestimmt.

bei der Aktivierung der Caspase-3 im Verlauf der Virusinfektion hin. Um dies zu überprüfen, wurde die für die Caspase-9-Aktivierung erforderliche Translokation des Cytochrom C näher untersucht.

4.3.4. Freisetzung von Cytochrom C

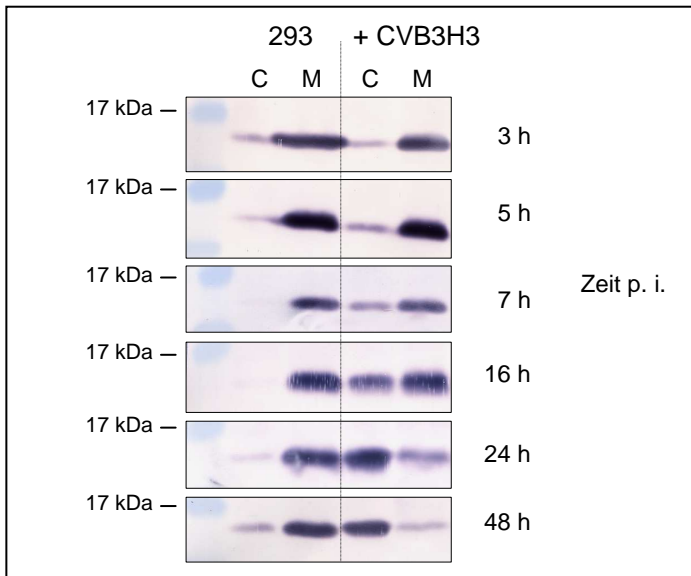


Abb. 39: Nachweis der Cyt C-Freisetzung nach Infektion von 293-Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 2,5) mittels Western Blot. Je 60 µg Protein wurden auf einem 12,5%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. C: zytosolische Fraktion; M: mitochondriale Fraktion

Die Aktivierung der Caspase-9 erfolgt über den intrinsischen Apoptoseweg am Apoptosom, wobei die Freisetzung von Cyt C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma notwendig ist. Um dies zu analysieren, wurden 293 Zellen mit CVB3H3 infiziert (m.o.i. 2,5), nach verschiedenen Zeiten eine Fraktionierung in zytoplasmatische und mitochondriale Zellbestandteile vorgenommen und mittels Western Blot auf das Vorhandensein von Cyt C untersucht. Dabei zeigte sich, dass (beginnend 5 h p. i.) mit fortschreitender Infektion eine zu-

nehmende Translokation des Cyt C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma beobachtet werden konnte (Abb. 39) und damit der intrinsische Apoptoseweg initiiert wurde.

4.3.5. Analyse der Expression Apoptose-relevanter Gene mit Hilfe der cDNA-Array Technologie

Um die Expression verschiedener Gene untersuchen zu können, die in die Regulierung und Ausführung der Apoptose involviert sind, wurde ein cDNA-Array der Firma SuperArray verwendet („GEArray Q Series Human Apoptosis“). Auf dieser Membran sind 96 genspezifische doppelsträngige cDNA-Fragmente (250-600 bp) aufgebracht, wobei jeder einzelne Signalfleck aus 4 getrennten Punkten gebildet wird, was somit eine Kontrolle der Signalspezifität ermöglicht. Für die Expressionsanalyse wurde die RNA aus 293-Zellen isoliert, die für 8 h mit CVB3H3 (m.o.i. 2,5) infiziert waren. Diese RNA wurde in cDNA umgeschrieben und linear amplifiziert, wobei gleichzeitig eine Markierung mit Biotin-16-dUTP's erfolgte. Nach Hybridisierung der Membran mit der biotinylierten-cDNA konnte deren

Bindung durch die Verwendung von Alkalische-Phosphatase-gekoppeltem Streptavidin und einem entsprechenden Chemilumineszenz-Substrat auf einem Röntgenfilm detektiert werden (Abb. 40).

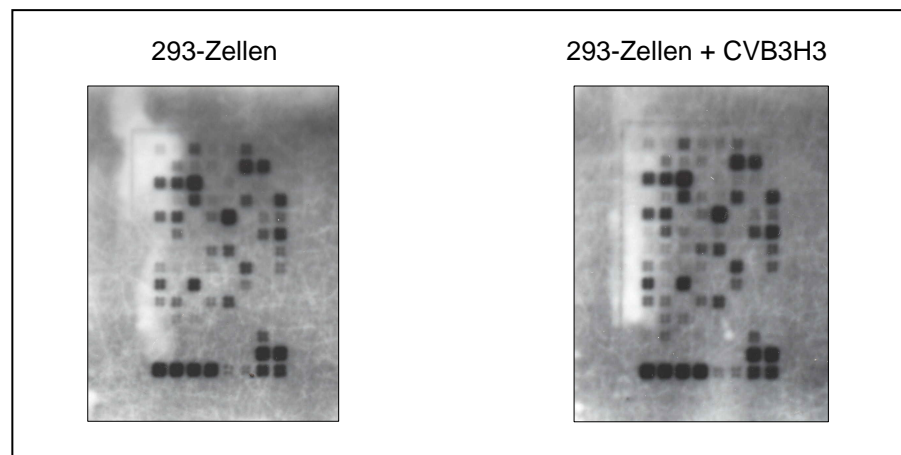


Abb. 40: Verstärkte Expression Apoptose-regulierender Gene in 293-Zellen 8 h nach Infektion mit CVB3H3 (m.o.i. 2,5). Die RNA infizierter und nicht infizierter 293-Zellen wurde isoliert und die Genexpression mit Hilfe des „Human Apoptosis Gene Array“ (SuperArray) untersucht.

Für die Auswertung stand eine Software der Firma SuperArray zur Verfügung, die es ermöglichte, die Signalintensität der einzelnen Flecken auf die Signalstärke verschiedener Haushalts-Gene, die ebenfalls auf der Membran detektiert wurden, zu beziehen. Durch diesen Abgleich innerhalb der einzelnen Membranen konnte im Anschluss das Expressionsmuster von nicht infizierten und CVB3H3-infizierten 293-Zellen miteinander verglichen werden. Tabelle 3 zeigt, dass 8 h nach Infektion mit CVB3H3 die Expression von 26 der 96 getesteten Apoptose-relevanten Gene verändert war, wobei in allen Fällen eine Überexpression stattfand. Die auffälligste Erhöhung der Expression betraf das Gen für das Tumorsuppressor Protein p53, das eine bedeutende Rolle in der Induktion der Apoptose besitzt. Daneben verstärkte sich durch die Virusinfektion aber auch die Transkription anderer wichtiger proapoptotischer Gene, wie dem für Apaf-1 – dem Adapterprotein zur Aktivierung der wichtigen intrinsischen Initiatorcaspase, der Caspase-9. Auch das Gen für die Caspase-aktivierte DNase DFF40, die für die Kondensierung und Fragmentierung des Chromatins verantwortlich ist, wurde vermehrt abgelesen. Zwei weitere hochregulierte Genprodukte (CHK2 und RPA3) spielen eine modulatorische Rolle bei der zellulären Antwort auf Schädigungen der DNA. CHK2 ist ein nukleäres Protein das zur Familie der Serin-Threonin-Kinasen gehört und als Regulator bei der Kontrolle des Zellzyklus von Bedeutung ist. Die Aktivierung von CHK2 durch die Kinase ATM verhindert durch die Inhibierung der CDC25C-Phosphatase den Eintritt der Zelle in die Mitose. Außerdem führt CHK2 zu einer Stabilisierung des p53-Proteins und unterstützt damit den Stillstand des Zellzyklus am G1-Restriktionspunkt und die Apoptose-induzierende Funktion des p53-Proteins [78]. Das Replikationsprotein A ist ein heterotrimeres Protein, das an einzelsträngige DNA bindet und

essentielle Funktionen im Nukleinsäure-Metabolismus (wie DNA-Replikation, -Reparatur und -Rekombination) besitzt. Auch RPA kann durch die Kinase ATM phosphoryliert werden, wodurch dessen Aktivität beeinflusst wird. Daneben besitzt RPA aber auch eine Funktion als Regulator von Zellzyklus-Restriktionspunkten durch seine Beteiligung bei der Rekrutierung der Kinase ATR zu geschädigten Chromatin-Regionen, wodurch Signale an den Kontrollpunkten des Zellzyklus initiiert werden [53, 78]. Die verstärkte Transkription des Gens, das für das p63 Protein kodiert, ist ein Beispiel für die Beeinflussung der Cytoskelettstrukturen durch die Infektion mit CVB3H3. p63 ist ein integrales Membranprotein des ER, dessen zytoplasmatischer Teil an Mikrotubuli bindet, wodurch das ER am Mikrotubuli-Netzwerk verankert wird. Die Funktion des p63 ist durch dessen Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung beeinflussbar. Das während der Interphase vorliegende nicht-phosphorylierte p63 ist für die stabile Verankerung des ER und dessen räumlicher Verteilung erforderlich, wohingegen es während der Mitose zur Phosphorylierung des Proteins und damit verbunden zum Zusammenbruch des ER um den Zellkern herum kommt, wobei das Mikrotubuli-Netzwerk intakt bleibt [208].

Nahezu dreiviertel der 8 h nach Infektion hochregulierten Gene besitzt eine direkte Funktion im extrinsischen, Rezeptor-vermittelten Apoptoseweg – als Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie (z. B. DR3; DR4; DR5; Fas), als deren Liganden (z. B. LT- β ; TNF- β) oder assoziierte Faktoren (z. B. RIP; Rip2). Interessanterweise wurden neben diesen Genprodukten mit proapoptotischen Wirkungen auch einige mit antiapoptotischen Funktionen verstärkt exprimiert. Dazu gehören die beiden Rezeptoren DcR1 (TRAIL-R3) und DcR2 (TRAIL-R4), die eine Weiterleitung proapoptotischer Signale inhibieren. Sie wirken kompetitiv über den gemeinsamen Liganden TRAIL, den sie ebenso wie die proapoptotischen homologen Rezeptoren DR4 (TRAIL-R) und DR5 (TRAIL-R2) binden können, wobei jedoch durch das Fehlen funktioneller C-terminaler Domänen die Signalübertragung inhibiert und eine Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Caspasen unterbunden wird. Auch die Rezeptor-assoziierten Faktoren TRAF1 und 2 induzieren nach ihrer Bindung an den Rezeptor alternative, antiapoptotische Signalwege der TNF-Rezeptor Superfamilie (z. B. über NF- κ B, c-Jun). Ein weiteres verstärkt transkribiertes Genprodukt war Mcl-1, das zur Familie der Bcl-2 Proteine gehört und wie dieses antiapoptotisch wirken und die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran durch die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie inhibieren kann. Allerdings wurden von Mcl-1 zwei Spleißvarianten identifiziert, wobei die Volllänge Mcl-1 mit BH1, BH2, BH3 und Transmembrandomäne antiapoptotisch wirkt, bei der kürzeren Form jedoch durch den Spleißprozess (Entfernung des zentralen Exon 2) und eine Leserahmenverschiebung nur die BH3-Domäne intakt bleibt, wodurch die Apoptose-induzierende Wirkung dieser Variante begründet wird [20, 11].

Gen	Funktion	Expression (Faktor x)
TNF-Rezeptor Familie		
DR3 (Apo3)	TNF-Rezeptor Superfamilie, Nr. 25	4,10
TRAIL-R3 (DcR1)	TNF-Rezeptor Superfamilie, Nr. 10c	3,19
CD27	TNF-Rezeptor Superfamilie, Nr. 7	2,89
CD40 (NGFR)	TNF-Rezeptor Superfamilie, Nr. 5	2,31
LTbR	Lymphotoxin beta Rezeptor	2,11
CD30	TNF-Rezeptor Superfamilie, Nr. 8	1,90
TRAIL-R2 (DR5) (KILLER)	TNF-Rezeptor Superfamilie, Nr. 10b	1,71
TRAIL-R4 (DcR2)	TNF-Rezeptor Superfamilie, Nr. 10d	1,58
Fas (Apo-1) (CD95)	TNF-Rezeptor Superfamilie, Nr. 6	1,53
TRAIL-R (DR4)	TNF-Rezeptor Superfamilie, Nr. 10a	1,52
TNFRSF14	TNF-Rezeptor Superfamilie, Nr. 14	1,50
TNF-Ligand Familie		
OX40 L	TNF (Ligand) Superfamilie, Nr. 4	2,08
CD40L (CD154)	TNF (Ligand) Superfamilie, Nr. 5	2,00
LT-b (LT-β)	Lymphotoxin beta (TNF Superfamilie, Nr. 3)	1,93
TNF-β (LT)	Lymphotoxin alpha (TNF Superfamilie, Nr. 1)	1,92
TRAF Familie		
TRAF1	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 1	2,89
TRAF2	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 2	1,69
„Death Domain“ Familie		
RIP	Rezeptor-interagierende Ser/Thr-Kinase 1	2,93
Bcl-2 Familie		
MCL-1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (Bcl-2 related)	1,60
CARD Familie		
Apaf-1	Apoptotischer Protease-aktivierender Faktor	2,55
Rip2 (Cardiac)	Rezeptor-interagierende Ser/Thr-Kinase 2	2,01
p53 und ATM Signalweg		
p53	Tumorsuppressor Protein p53	7,84
CHK2 (RAD53)	CHK2 Checkpoint Homolog (<i>S. pombe</i>)	2,42
p63	Cytoskelett-assoziiertes Protein 4	1,94
RPA3	Replikationsprotein A3, 14 kDa	1,77
„CIDE-Domain“ Familie		
DFF40 (CAD)	DNA Fragmentierungsfaktor, 40 kDa, (Caspase-aktivierte DNase)	1,65

Tabelle 3: Überexpression verschiedener Gene, die in die Regulation und Weiterleitung der Apoptose nach Infektion (8 h) von 293-Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 2,5) involviert sind. Verwendet wurde dafür ein cDNA-Array der Firma SuperArray Bioscience Corporation („GEArray Q Series Human Apoptosis Gene Array“) und die Gene berücksichtigt, deren Expression im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle um einen Faktor $\geq 1,5x$ verändert war.

4.4. Einfluss des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk auf die Replikation von CVB3H3

4.4.1. Hemmung des zytopathischen Effekts und Verzögerung des Zelltods

Um zu untersuchen, inwieweit die von CVB3H3 induzierten apoptotischen Prozesse einen Einfluss auf die Virusreplikation haben, wurde der pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk eingesetzt. Dieser Inhibitor stellt ein Substrat für alle Caspasen dar, besitzt aber 2 Modifikationen. Die Benzyloxycarbonyl-Gruppe (-z-) dient zur Erhöhung der Zellpermeabilität, während die Fluoromethylketon-Gruppe (-fmk-) zu einer kovalenten, irreversiblen Bindung des Inhibitors an das Cystein im aktiven Zentrum der Caspasen und dadurch zu deren Inhibierung führt.

Wie Abbildung 41 zeigt, wurde in 293-Zellen, die zeitgleich zur CVB3H3-Infektion mit z-VAD-fmk behandelt wurden, das Auftreten des ZPE verzögert. Der Zellrasen unbehandelter, infi-

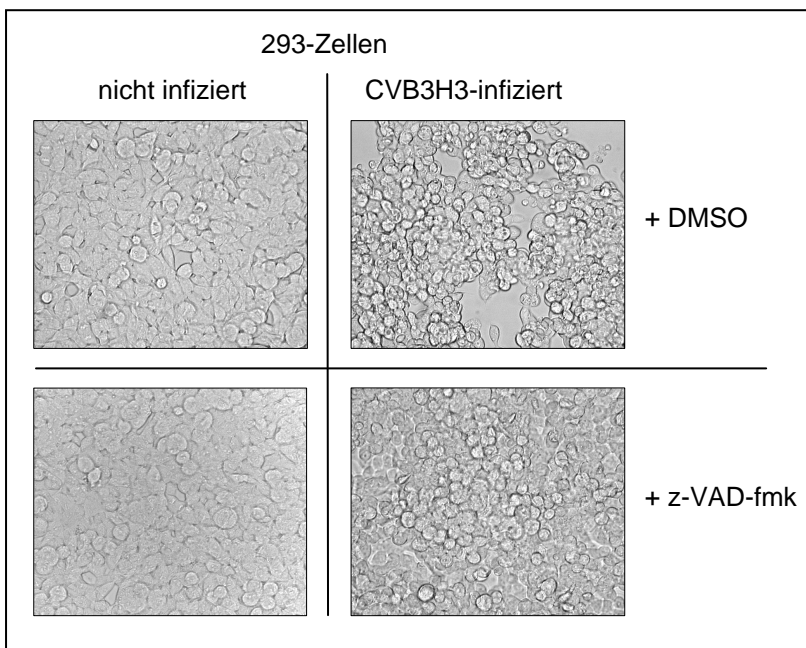


Abb. 41: Reduktion des ZPE durch die Zugabe des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk während der Infektion von 293-Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 2,5). Die Zugabe von z-VAD-fmk (50 μ M) bzw. DMSO (Lösungsmittelkontrolle) erfolgte zeitgleich mit der Infektion. Lichtmikroskopische Aufnahmen 12 h p. i. Vergrößerung: 400x

zierter Zellen war 12 h p. i. zerstört, die Zellen erschienen abgerundet, losgelöst und ihre Zellinhalte kondensiert. Obwohl eine beginnende Abrundung der Zellen bei Zugabe von z-VAD-fmk erkennbar war, blieb der Zellrasen intakt und die Zellen erschienen deutlich homogener.

Dieser positive Einfluss auf die Zellmorphologie durch z-VAD-fmk wurde durch eine Bestimmung der Zellvitalität mittels Trypanblaufär-

bung bestätigt (Abb. 42). Durch Zugabe von z-VAD-fmk blieb der Anteil lebender Zellen nach Infektion mit CVB3H3 bis zu 16 h p. i. deutlich erhöht (Abb. 43).

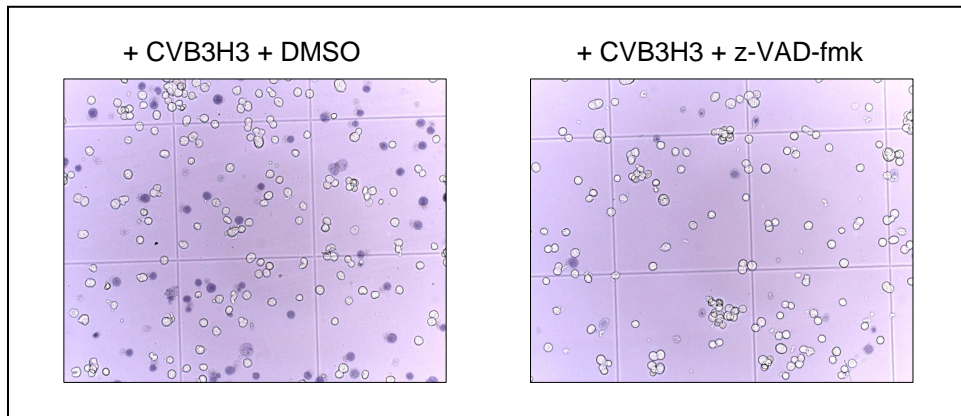


Abb. 42: Inhibierung des Virus-induzierten Zelltodes durch den pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk. Die Vitalität von CVB3H3-infizierten 293-Zellen (m.o.i. 2,5) wurde 7 h p. i. mittels Trypanblaufärbung untersucht und verglichen mit der von Virus-infizierten, z-VAD-fmk (50 μ M) behandelten Zellen.

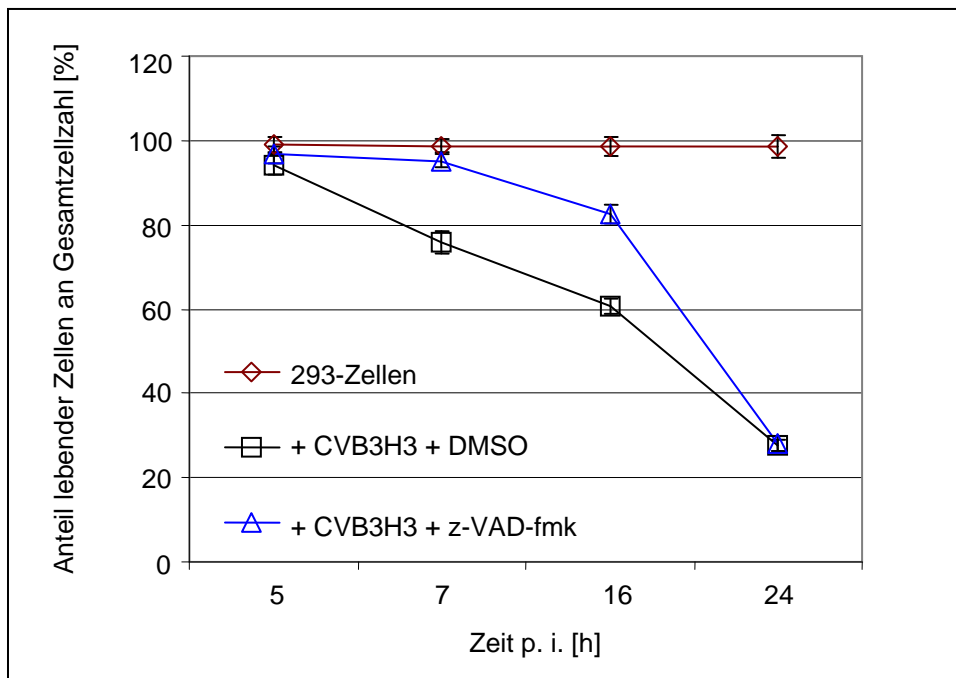


Abb. 43: Verzögerung des Absterbens Virus-infizierter Zellen nach Zugabe des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk. 293-Zellen wurden mit CVB3H3 infiziert (m.o.i. 2,5) und gleichzeitig mit z-VAD-fmk (50 μ M) bzw. DMSO behandelt. Zu den angegebenen Zeiten wurde der Anteil lebender Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD aus jeweils 3 Proben/Zeitpunkt.

4.4.2. Inhibierung der Cytochrom C-Freisetzung durch z-VAD-fmk

Abgesehen von der positiven Wirkung des Caspase-Inhibitors auf die Morphologie und Vitalität CVB3-infizierter Zellen konnte auch eine Beeinflussung der Cyt C-Freisetzung in Virus-infizierten Zellen bei Zugabe von z-VAD-fmk nachgewiesen werden. Die deutlich verzögert stattfindende Translokation von Cyt C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma war erst zwischen 16 und 24 h p. i. im Western Blot erkennbar (Abb. 44). Diese Wirkung von

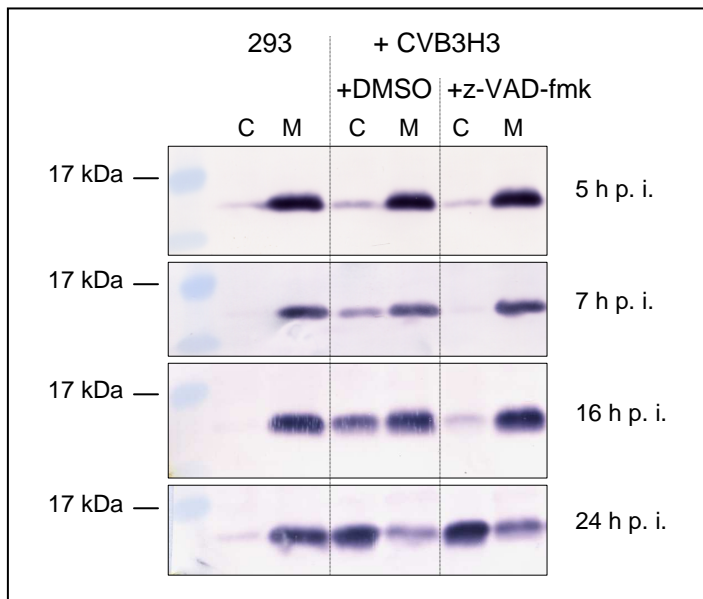


Abb. 44: Inhibierung der CVB3H3-induzierten Cyt C-Freisetzung in 293-Zellen durch z-VAD-fmk. 293-Zellen wurden infiziert (m.o.i. 2,5) und gleichzeitig mit z-VAD-fmk (50 μ M) bzw. DMSO versetzt. Je 60 μ g Protein wurden auf einem 12,5%-igen SDS-PAA-Gel mittels Western Blot analysiert. C: zytosolische Fraktion; M: mitochondriale Fraktion

z-VAD-fmk könnte für eine Caspase-abhängige Permeabilisierung der mitochondrialen Membran sprechen.

Es stellte sich die Frage, ob die beobachteten Effekte des Caspase-Inhibitors in CVB3H3-infizierten Zellen unmittelbar über eine Wirkung von z-VAD-fmk auf die Caspasen und deren Beteiligung am ZPE sowie der Cyt C-Freisetzung bedingt waren oder ob z-VAD-fmk die Replikation von CVB3H3 direkt beeinflusste.

4.4.3. Inhibierung der Virusreplikation durch z-VAD-fmk

Um den Einfluss von z-VAD-fmk auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden 293-Zellen 1 h vor der CVB3H3-Infektion mit 50 μ M z-VAD-fmk bzw. DMSO versetzt und der Virustiter 3, 6, 12 und 24 h p. i. bestimmt (Abb. 45A). Dabei zeigte sich, dass z-VAD-fmk die Virusreplikation zu Beginn der Infektion inhibierte, der Gesamtvirustiter am Versuchsende

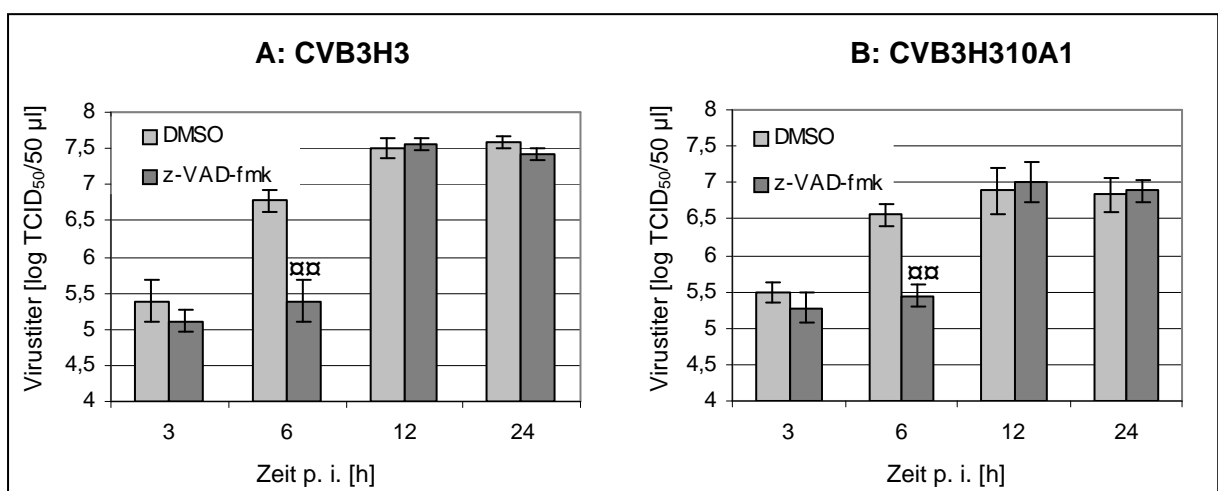


Abb. 45: Inhibierung der Replikation von CVB3H3 (A) bzw. CVB3H310A1 (B) in 293-Zellen durch die Zugabe von z-VAD-fmk. Die Zellen wurden 1 h vor der Virusinfektion (m.o.i. 2,5) mit z-VAD-fmk (50 μ M) bzw. DMSO behandelt. Die Bestimmung des Virustiters zu den angegebenen Zeiten erfolgte mittels TCID₅₀-Test. Dargestellt sind die MW \pm SD aus jeweils 3 Proben/Zeitpunkt. (**: $P < 0,01$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im Student'schen t-Test)

jedoch nicht beeinflusst wurde. Bei einer Erhöhung der Konzentration von z-VAD-fmk auf 200 μM verlängerte sich seine inhibierende Wirkung (nicht dargestellt). Gleiche Ergebnisse ergaben Experimente mit CVB3H310A1 (Abb. 45B).

Um die transiente Wirkung des Caspase-Inhibitors auf die Virusreplikation eingehender zu untersuchen, wurden 293-Zellen zu unterschiedlichen Zeiten mit z-VAD-fmk behandelt: entweder 2 h vor der Infektion mit CVB3H3, zeitgleich mit der Infektion oder 3 h p. i. In Abbildung 46 werden die unterschiedlichen Auswirkungen auf den Virustiter sichtbar. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Inhibitorzugabe wurde zwölf Stunden nach Infektion keine oder aber eine teilweise bzw. vollständige Inhibierung der viralen Replikation nachgewiesen.

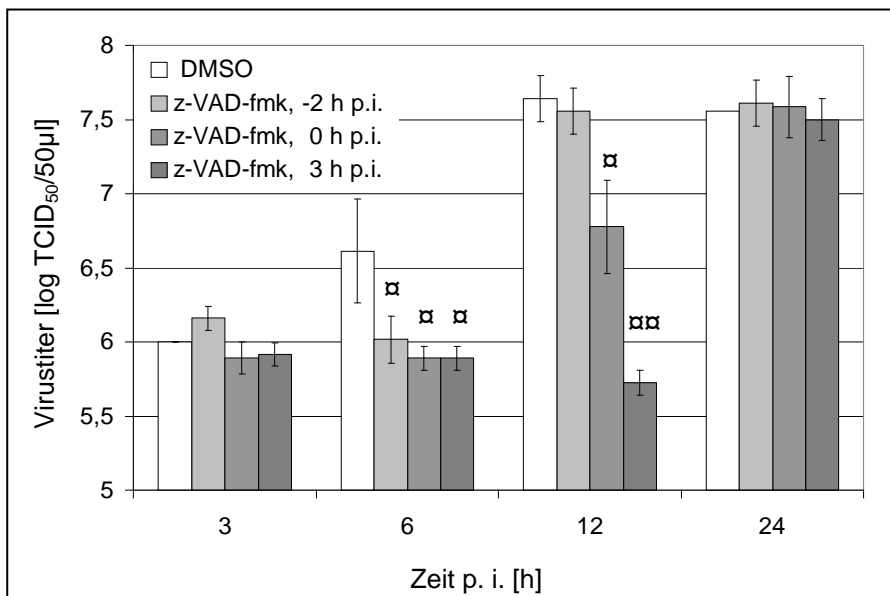


Abb. 46: Transiente Wirkung von z-VAD-fmk auf die Virusreplikation. Die Bestimmung des Virustiters mittels TCID₅₀-Test erfolgte nach Infektion von 293-Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 2,5) und Zugabe von z-VAD-fmk (50 μM) bzw. DMSO 2 h vor, zeitgleich mit der Infektion oder 3 h p. i. Dargestellt sind die MW \pm SD aus jeweils 3 Proben/Zeitpunkt. (α : $P < 0,05$; $\alpha\alpha$: $P < 0,01$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im Student'schen t-Test)

Um zu klären, ob dieser Effekt von z-VAD-fmk indirekt über die Inhibierung der Caspasen und somit der Apoptose oder aber über eine direkte Wirkung auf das Virus zustande kam, wurde der Einfluss von z-VAD-fmk auf die virale RNA- und Protein-Synthese untersucht.

4.4.4. Einfluss von z-VAD-fmk auf die virale RNA-Synthese

CVB3H3-infizierte 293-Zellen wurden 3 h p. i. mit z-VAD-fmk (50 μM) oder mit DMSO als Kontrolle behandelt. Zu verschiedenen Zeiten wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und die Virus-spezifischen Sequenzen für das Kapsidprotein VP2 sowie die 2A-Protease und für das zelluläre β -Aktin (als Kontrolle der RNA-Aufarbeitung) amplifiziert. Abbildung 47 zeigt, dass durch die Zugabe des pan-Caspase-Inhibitors die Replikation der viralen RNA bis zu 12 h p. i. verhindert wurde.

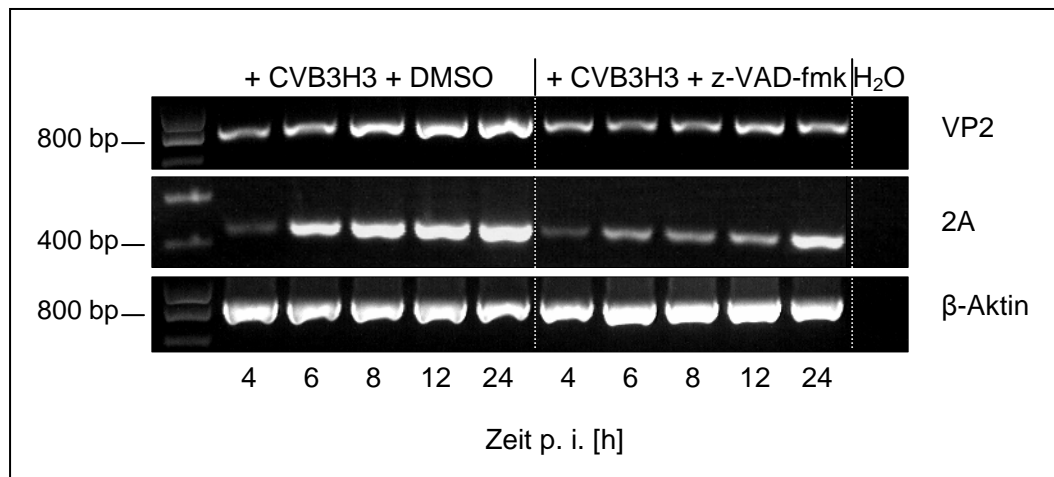


Abb. 47: Inhibierung der viralen RNA-Synthese in CVB3H3-infizierten Zellen durch z-VAD-fmk. Die Zellen wurden infiziert (m.o.i. 2,5) und 3 h p. i. z-VAD-fmk (50 μ M) bzw. DMSO zugegeben. Nach Isolierung der RNA erfolgte eine RT-PCR für die viralen Gene VP2 und 2A sowie β -Aktin zur Kontrolle der RNA-Qualität.

Durch real-time PCR konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Nach RNA-Isolierung und reverser Transkription wurden dabei kurze Sequenzen sowohl aus dem Bereich der 2A-Protease als auch der 3C-Protease amplifiziert und durch die Fluoreszenz des Farbstoffs SYBR Green I detektiert und quantifiziert. In Abbildung 48 wird deutlich, dass keinerlei Replikation viraler RNA bis zu 12 h p. i. nachweisbar war, wenn CVB3H3-infizierte Zellen mit z-VAD-fmk behandelt wurden. Erst 24 h p. i. erhöhte sich die Anzahl der viralen RNA-Kopien.

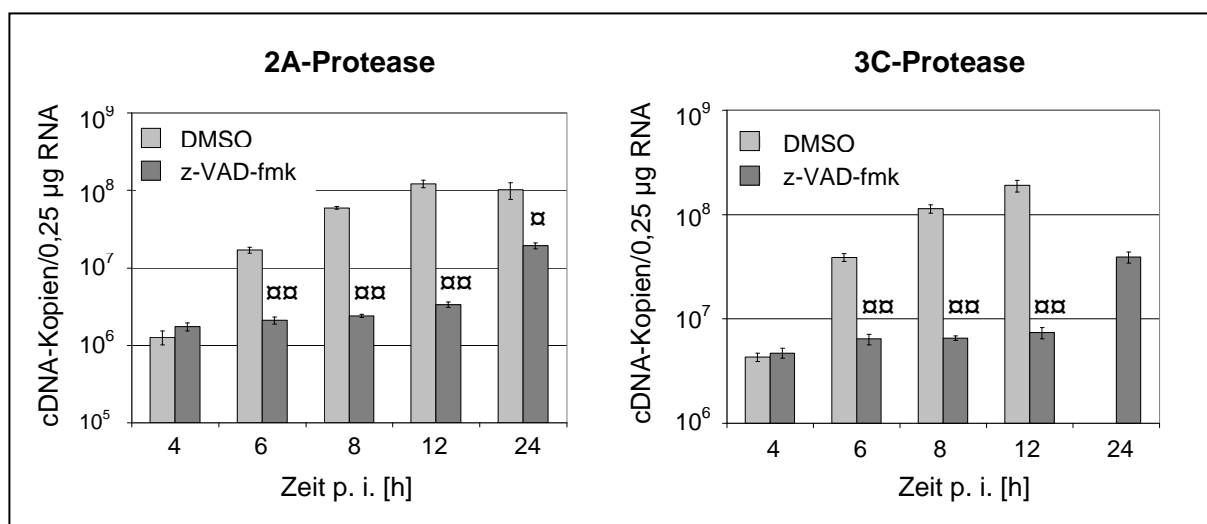


Abb. 48: Nachweis der Inhibierung der viralen RNA-Synthese durch z-VAD-fmk mittels real-time PCR. 293-Zellen wurden mit CVB3H3 infiziert (m.o.i. 2,5) und 3 h p. i. mit z-VAD-fmk (50 μ M) bzw. DMSO versetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die cDNA-Kopien bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD aus jeweils 3 Proben/Zeitpunkt. (Aufgrund der geringen RNA-Konzentration der Probe „DMSO-24 h“ konnte diese in der 3C-spezifischen PCR nicht getestet werden. α : $P < 0,05$; $\alpha\alpha$: $P < 0,01$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im Student'schen t-Test)

4.4.5. Einfluss von z-VAD-fmk auf die virale Proteinsynthese

Erwartungsgemäß ließ sich die Inhibierung der viralen RNA-Replikation durch den pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk auch auf der Ebene der viralen Proteinsynthese nachweisen. Dargestellt ist dies in 2 Abbildungen. Für das Experiment in Abbildung 49 wurde eine rekombinante CVB3H3-Variante verwendet, bei der vor der P1-Region die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein EGFP (und für die Schnittstelle der 3C-Protease) inseriert wurde. Dadurch wird EGFP während der Virusreplikation mitgebildet und ist mikroskopisch detektierbar. 293-Zellen, die mit dem Virus CVB3H3/EGFP infiziert wurden, zeigten 6 h p. i. eine deutliche Expression des fluoreszierenden Proteins. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von z-VAD-fmk zur nahezu vollständigen Inhibierung der EGFP-Synthese.

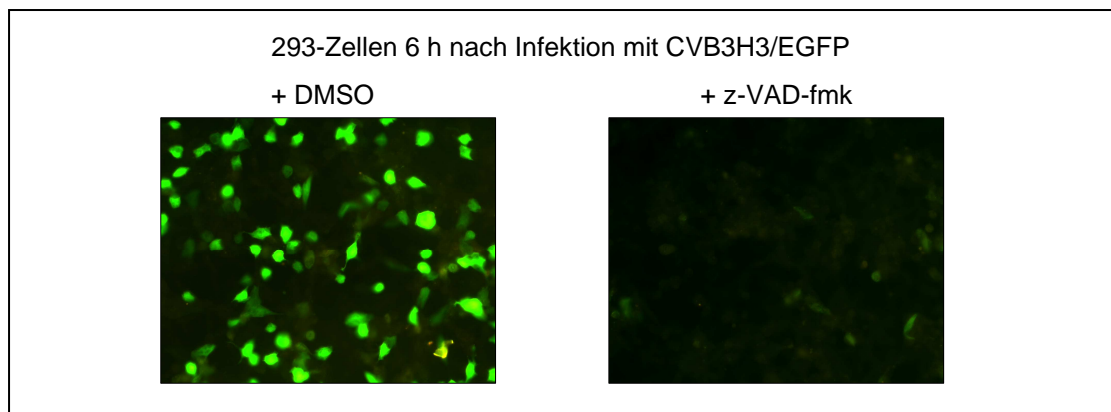


Abb. 49: Inhibierung der EGFP-Fluoreszenz in CVB3H3/EGFP-infizierten Zellen durch z-VAD-fmk. 293-Zellen wurden infiziert (m.o.i. 5), zeitgleich mit z-VAD-fmk (50 μ M) bzw. DMSO versetzt und 6 h p. i. fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Vergrößerung: 400x

Für den Nachweis der Proteinsynthesehemmung anhand eines viralen Proteins wurde das VP2-Kapsidprotein verwendet, da hierfür ein His₆-VP2(CVB3H3)-generiertes, polyklonales Kaninchen-Antiserum zur Verfügung stand. Aus 293-Zellen, die 4 h nach einer CVB3H3-Infektion mit z-VAD-fmk bzw. DMSO behandelt waren, wurden die Proteine isoliert und im Western Blot untersucht. In Abbildung 50 ist erkennbar, dass z-VAD-fmk zu einer deutlichen Reduktion des VP2-Signals zwischen 6 h und 12 h p. i. führte.

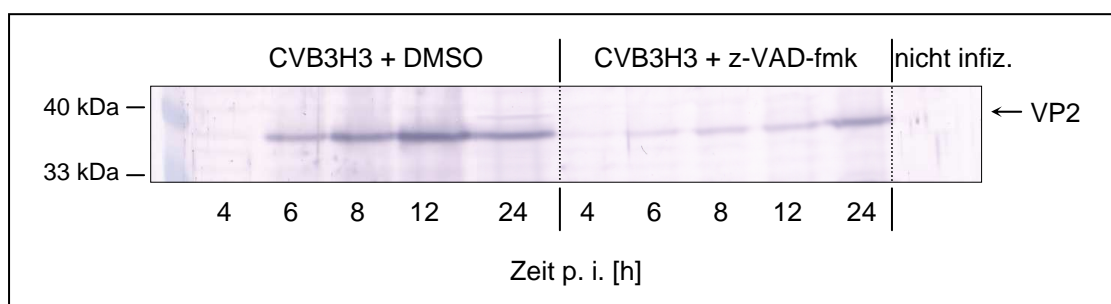


Abb. 50: Inhibierung der Synthese des viralen Kapsidproteins VP2 durch z-VAD-fmk. Je 35 μ g Protein aus CVB3H3-infizierten 293-Zellen (m.o.i. 2,5) mit Zugabe von z-VAD-fmk (50 μ M) bzw. DMSO 3 h p. i. wurden auf einem 10%-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot das VP2-Protein detektiert.

4.4.6. Inhibierung der viralen Protease-Aktivität durch z-VAD-fmk

Der deutliche, aber transiente Effekt des Caspase-Inhibitors auf die Replikation von CVB3H3 lässt eher eine direkte Wirkung der Substanz auf das Virus, als einen indirekten Apoptose-vermittelten Einfluss vermuten. Daher wurde untersucht, ob z-VAD-fmk die Aktivität der viralen Proteasen inhibiert und für diesen Test das zelluläre poly(A)-bindende Protein (PABP) als natürliches Substrat beider Proteasen verwendet. Für diese *in vitro* Experimente wurden die Sequenzen der 3C-Protease (20 kDa) sowie des PABP (71 kDa) in pET-Expressionsvektoren kloniert, was die Expression der rekombinanten Proteine mit His₆-tag in *E. coli* BL21(DE3) und ihre native Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie über Ni-NTA Agarose ermöglichte (Abb. 51). Gereinigte 2A-Protease (16 kDa) wurde freundlicherweise von Dr. J. Seipelt (Universität Wien) zur Verfügung gestellt.

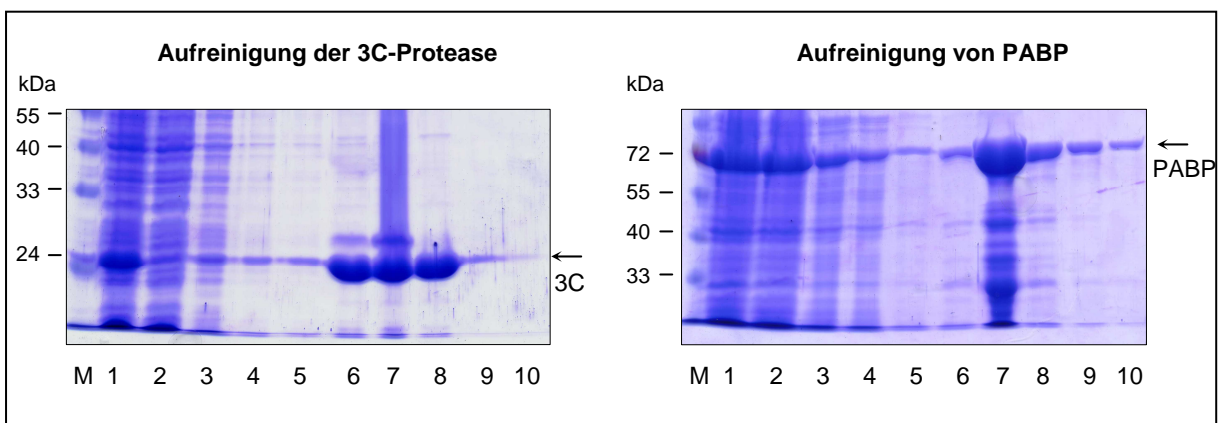


Abb. 51: Präparative Aufreinigung der 3C-Protease von CVB3H3 und des PABP. Nach Expression der rekombinanten Proteine (3C-His₆ bzw. His₆-PABP) in *E. coli* wurden diese unter Verwendung von Ni-NTA Agarose unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Je 8 µl jeder Fraktion wurden auf einem SDS-PAA-Gel analysiert (10%-ig bzw. 7,5%-ig). M: Proteinmarker; Spur 1: geklärtes Lysat; Spur 2: Durchlauf; Spur 3-5: Waschfraktionen 1-3; Spur 6-10: Eluate 1-5

Für die Protease-Aktivitätstests wurden jeweils 8 µg gereinigte 2A- bzw. 3C-Protease mit 8 µg PABP und 20 µM z-VAD-fmk (bzw. DMSO als Kontrolle) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse des PABP erfolgte anschließend durch die Auftrennung der Reaktionsansätze mittels SDS-PAGE. Wie die Kontrollansätze zeigten, führten beide Proteasen zur Spaltung des PABP, wobei durch die Aktivität der 3C-Protease ein 60 kDa-Fragment und durch die 2A-Protease ein 55 kDa-Fragment als charakteristische Spaltprodukte entstanden (Abb. 52A/B, Spuren 2 und 3). Die Aktivität der viralen Proteasen wurde durch die Zugabe von 20 µM z-VAD-fmk nahezu vollständig gehemmt (Abb. 52A/B, Spur 4).

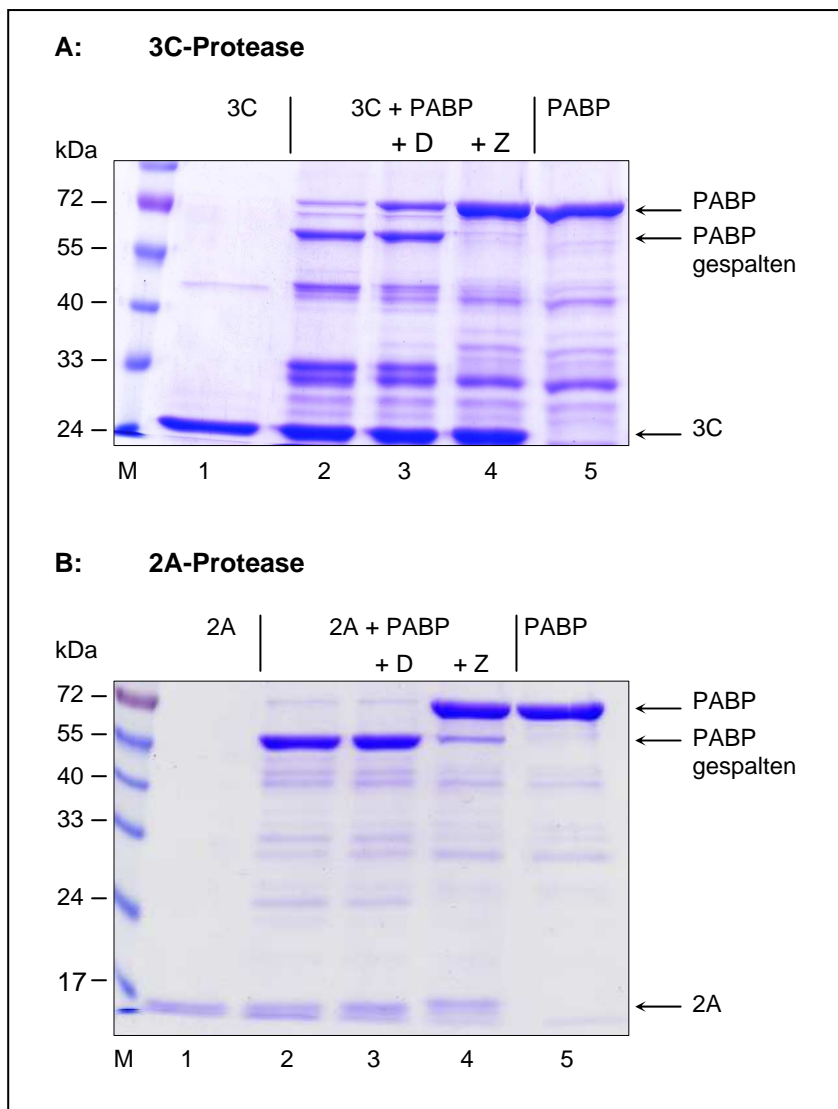


Abb. 52: Inhibierung der Aktivität der viralen 3C- und 2A-Protease durch z-VAD-fmk *in vitro*. Die gereinigte 3C-Protease (A) bzw. 2A-Protease (B) sowie das Substrat PABP wurden über Nacht inkubiert (je 8 µg bei Raumtemperatur), entweder allein oder unter Zugabe von 20 µM z-VAD-fmk bzw. DMSO (Lösungsmittelkontrolle). Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf 10%- bzw. 12,5%-igen SDS-PAA-Gelen. M: Proteinmarker; Spur 1: gereinigte Protease; Spur 2-4: gereinigte Protease inkubiert mit PABP, Spur 3: Zusatz von DMSO („D“), Spur 4: Zusatz von z-VAD-fmk (20 µM; „Z“); Spur 5: gereinigtes PABP

Damit konnte gezeigt werden, dass der pan-Caspase Inhibitor z-VAD-fmk unspezifisch die Aktivität der 3C- und 2A-Protease von CVB3 hemmt. Der Inhibitor z-VAD-fmk besitzt zwei Modifikationen, die der Erhöhung der Zellpermeabilität dienen. Dazu gehört sowohl die bereits erwähnte Benzyloxycarbonyl-Gruppe (-z-) als auch die Methylierung des Aspartatrests von z-VAD-fmk. Die Veränderung der Aminosäure könnte die Ursache für die unspezifische Bindung des Caspase-Inhibitors an die coxsackieviralen Proteasen sein. Denn erfolgt nach der Aufnahme des Inhibitors die Demethylierung

des Aspartatrests durch zelluläre Esterasen, könnte diese intrazelluläre Veränderung von z-VAD-fmk dessen zeitlich begrenzte, inhibierende Wirkung begründen. Diese Möglichkeit sollte durch die Verwendung eines nicht methylierten pan-Caspase-Inhibitors untersucht werden.

4.5. Einfluss von nicht methylierten Caspase-Inhibitoren auf die Replikation von CVB3H3

4.5.1. Wirkung von q-VD-o-Ph auf die virale Protease-Aktivität

Für die Analyse der Wirkung von nicht methylierten Caspase-Inhibitoren auf die Virusreplikation wurde das rekombinante Virus CVB3H3/EGFP verwendet und die Expression von EGFP 6 h p. i. in Anwesenheit nicht methylierter Inhibitoren fluoreszenzmikroskopisch beurteilt. Um die intrazelluläre Demethylierung von z-VAD-fmk zu gewährleisten, erfolgte dessen Zugabe zu den Zellen schon 2 h vor deren Infektion. Als weitere Kontrolle wurden 293-Zellen zum Zeitpunkt der Infektion mit q-VD-o-Ph versetzt, einem irreversiblen, pan-Caspase-Inhibitor, dessen Aspartat nicht methyliert ist. Wie Abbildung 53 zeigt, hatten weder z-VAD-fmk noch q-VD-o-Ph einen Einfluss auf die Expression von EGFP in CVB3H3/EGFP-infizierten Zellen. Im Gegensatz dazu war in der Kontrolle, in der z-VAD-fmk erst zum Zeitpunkt der Infektion zugegeben wurde, die EGFP-Synthese vollständig inhibiert.

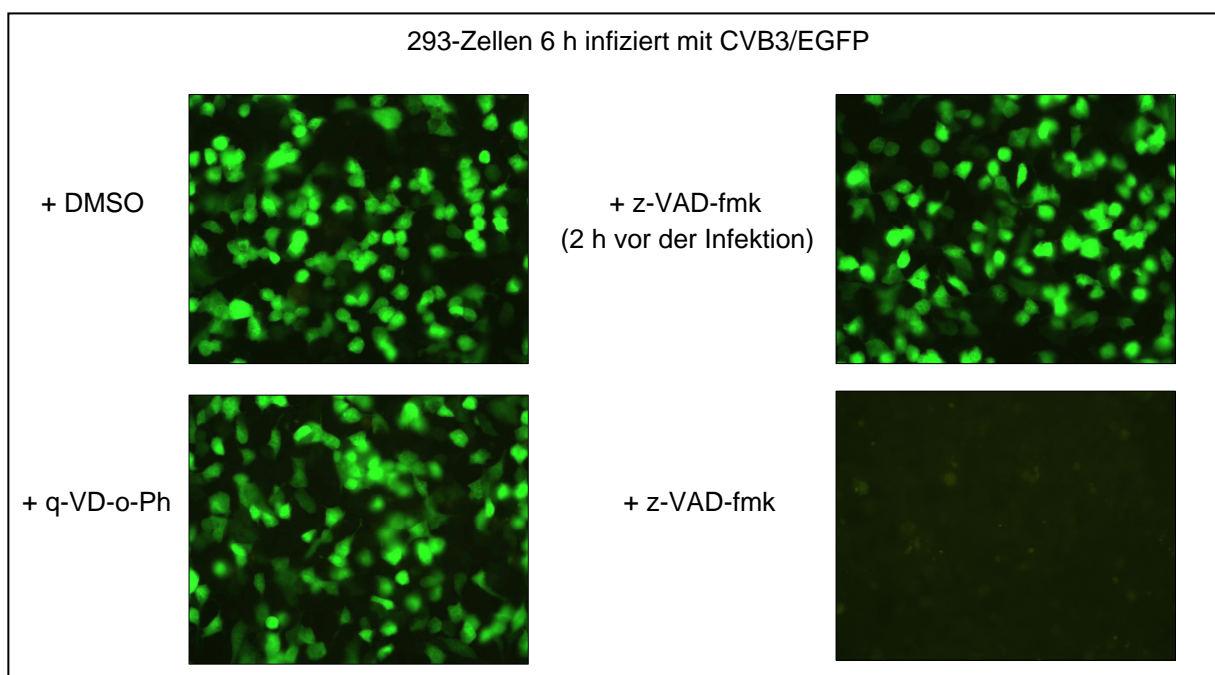


Abb. 53: Fehlende Inhibierung der EGFP-Expression bei Verwendung nicht methylierter pan-Caspase-Inhibitoren. 293-Zellen wurden 6 h mit CVB3H3/EGFP infiziert (m.o.i. 5) und mit z-VAD-fmk (50 μ M) 2 h vor der Infektion oder mit q-VD-o-Ph (100 μ M) zum Zeitpunkt der Infektion versetzt. Als Kontrollen wurden Zellen zeitgleich zur Virusinfektion mit DMSO oder z-VAD-fmk (50 μ M) behandelt. Vergrößerung: 400x.

Dieses Ergebnis konnte bei der Untersuchung der direkten Wirkung des nicht methylierten Caspase-Inhibitors q-VD-o-Ph auf die viralen Proteasen *in vitro* bestätigt werden. Dabei wurden wiederum die gereinigten Proteasen 3C bzw. 2A sowie ihr Substratprotein PABP über Nacht in Anwesenheit von q-VD-o-Ph inkubiert (Abb. 54). Wie in den Spuren 3 und 6 zu

erkennen ist, waren beide Proteasen in der Lage, PABP effizient zu spalten, auch wenn q-VD-o-Ph in zehnfach höherer Konzentration als z-VAD-fmk in vergleichbaren Experimenten (s. Abb. 52) eingesetzt wurde.

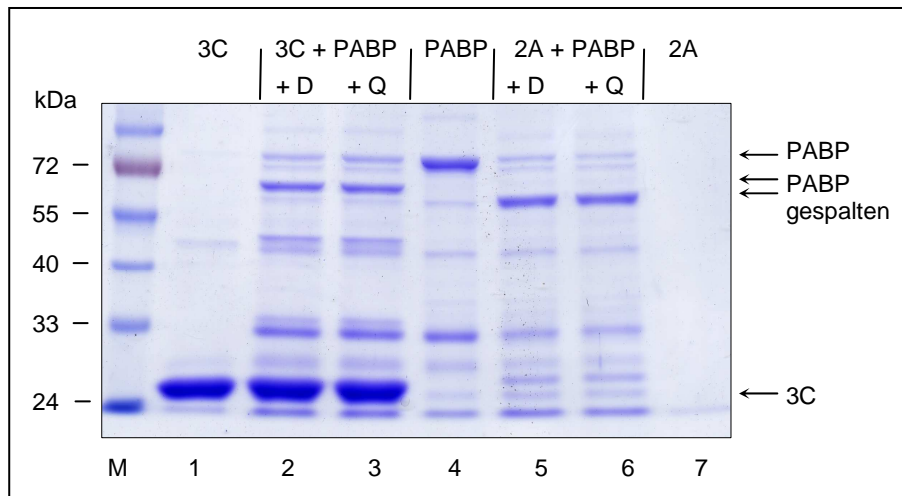


Abb. 54: Fehlende Inhibierung der 3C- und 2A-Protease-Aktivität *in vitro* durch den nicht methylierten pan-Caspase-Inhibitor q-VD-o-Ph. Die gereinigte 3C- bzw. 2A-Protease sowie das Substrat PABP wurden über Nacht inkubiert (je 8 µg bei Raumtemperatur), entweder allein oder unter Zugabe von q-VD-o-Ph („Q“; 200 µM) bzw. DMSO („D“) als Kontrolle. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 10%-igen SDS-PAA-Gel. M: Proteinmarker; Spur 1: 3C-Protease; Spur 2+3: 3C-Protease und PABP unter Zusatz von DMSO (Spur 2) und von q-VD-o-Ph (Spur 3); Spur 4: PABP; Spur 5+6: 2A-Protease und PABP unter Zusatz von DMSO (Spur 5) und von q-VD-o-Ph (Spur 6); Spur 7: 2A-Protease

4.5.2. Einfluss von q-VD-o-Ph auf die Virusreplikation

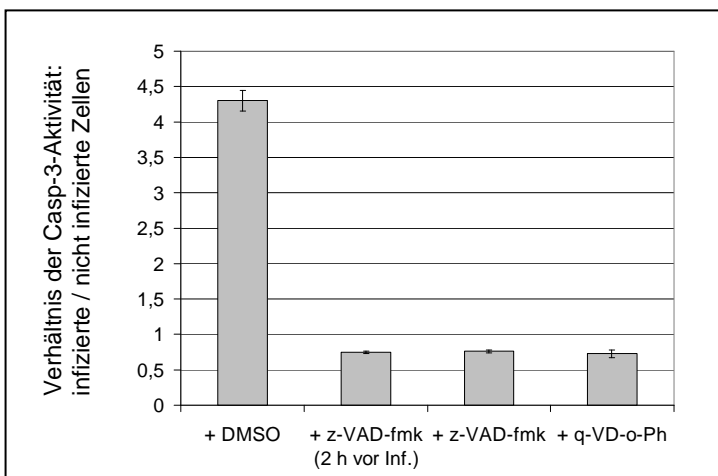


Abb. 55: Nachweis der inhibierenden Wirkung der pan-Caspase-Inhibitoren auf die Caspase-3-Aktivität in CVB3H3-infizierten Zellen. 293-Zellen wurden für 24 h infiziert (m.o.i. 2,5) und 2 h vor (z-VAD-fmk) bzw. zeitgleich mit der Infektion mit 50 µM Inhibitor (z-VAD-fmk, q-VD-o-Ph) oder mit DMSO versetzt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte luminometrisch. Dargestellt sind die MW \pm SD aus jeweils 3 Proben/Zeitpunkt.

Unter Verwendung dieses pan-Caspase-Inhibitors ohne unspezifische Wirkung auf die viralen Proteasen wurde erneut der Einfluss der Apoptose auf die Replikation von CVB3H3 untersucht. Der Nachweis einer effizienten Hemmung der Caspasen durch q-VD-o-Ph erfolgte dabei mit Hilfe des luminometrischen Aktivitätstests. Wie z-VAD-fmk führte dabei auch q-VD-o-Ph zu einer vollständigen Inhibierung der Caspa-

se-3-Aktivität in virusinfizierten 293-Zellen über einen Zeitraum von 24 h (Abb. 55).

Für die Analyse der q-VD-o-Ph-Wirkung wurde der Virustiter in 293-Zellen 3 h, 7 h und 18 h nach Infektion untersucht, wobei zwischen extra- und intrazellulärem Virus unterschieden wurde. Zum Vergleich erfolgte die Zugabe von z-VAD-fmk zum einen 2 h vor der Infektion um durch die intrazelluläre Demethylierung die unspezifische Inhibierung der viralen Proteasen zu verhindern und andererseits zeitgleich mit der Infektion als positive Kontrolle der transienten inhibierenden Wirkung. Abbildung 56 zeigt, dass die Virusreplikation zu Beginn scheinbar nicht durch q-VD-o-Ph beeinflusst wurde, da 7 h p. i. keine Unterschiede erkennbar waren. Im Gegensatz dazu wurde in der späten Phase des Replikationszykluses ein Einfluss des Caspase-Inhibitors auf die Virusfreisetzung sichtbar. Während extrazellulär weniger Virus in Anwesenheit von q-VD-o-Ph nachweisbar war, erhöhte sich gleichzeitig die Viruskonzentration innerhalb der Zellen. Eine ähnliche Wirkung wurde 18 h p. i. beobachtet, wenn z-VAD-fmk 2 h vor der Infektion zugegeben wurde, obwohl zu Beginn der Infektion eine unspezifische Inhibierung der viralen Proteasen durch eine scheinbar noch unvollständige Demethylierung zu erkennen war (keine nachweisbare Replikation bis 7 h p. i.). Bei der Zugabe von z-VAD-fmk zeitgleich mit der Infektion wurde erwartungsgemäß die unspezifische Inhibierung der Virusreplikation noch 18 h p. i. detektiert. Um das Ausmaß der Wirkung der pan-Caspase-Inhibitoren auf die Virusreplikation besser einschätzen zu können, wurde der Logarithmus der Daten in Abbildung 56 berücksichtigt. Wie dort schon dargestellt zeigte sich, dass die Inaktivierung der Caspasen die Virusfreisetzung deutlich reduzierte (Abb. 57B). Während in den Kontrollproben nahezu alle Viren extrazellulär zu finden waren, verringerte sich dieser Anteil in den Inhibitor-behandelten Proben auf 66% (q-VD-o-Ph) bzw. 68% (z-VAD-fmk, 2 h vor Infektion). Davon unabhängig wurde durch die pan-Caspase-Inhibi-

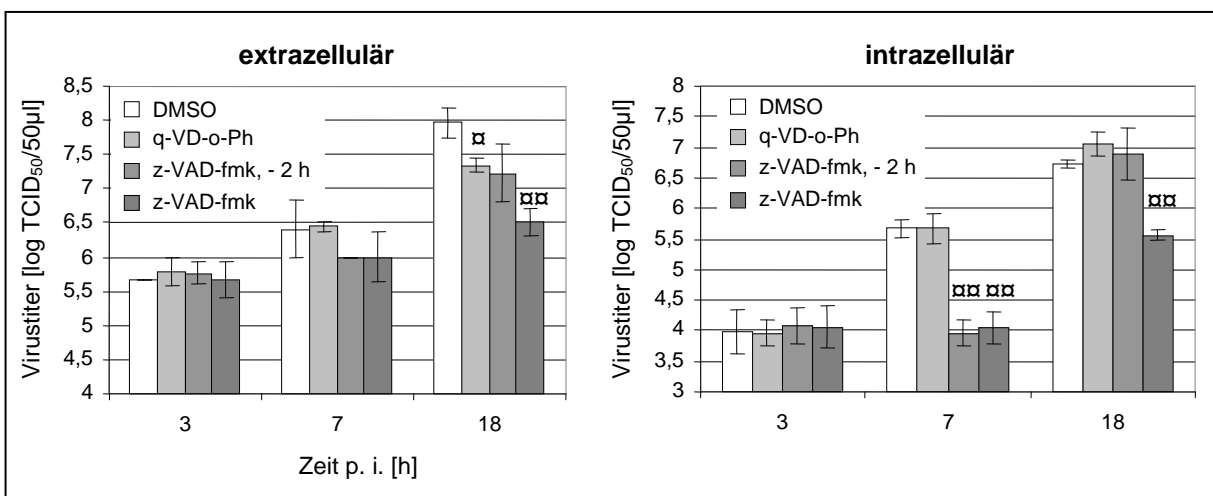


Abb. 56: Beeinflussung der Virusreplikation durch die Zugabe von pan-Caspase-Inhibitoren während der CVB3H3-Infektion in 293-Zellen. Zwei Stunden vor (z-VAD-fmk, -2h) bzw. zeitgleich (q-VD-o-Ph, z-VAD-fmk, DMSO) mit der Infektion (m.o.i. 2,5) wurden die pan-Caspase-Inhibitoren (je 50 µM) zugegeben. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte mittels TCID₅₀ zu den angegebenen Zeitpunkten im Überstand bzw. in den Zellen. Dargestellt sind die MW ± SD aus jeweils 3 Proben/Zeitpunkt. (α: $P < 0,05$; αα: $P < 0,01$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im Student'schen t-Test)

toren jedoch auch die Virusreplikation per se gehemmt (Abb. 57A). Bei Zugabe von q-VD-o-Ph bzw. z-VAD-fmk 2 h vor der Infektion sank die Viruskonzentration auf 34% (q-VD-o-Ph) bzw. 25% (z-VAD-fmk 2 h vor der Infektion) im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. Die Inhibierung der Caspasen hatte demnach sowohl eine negative Wirkung auf die intrazelluläre Replikation der Viren, als auch auf die Freisetzung der Virusnachkommen am Ende des Replikationszykluses.

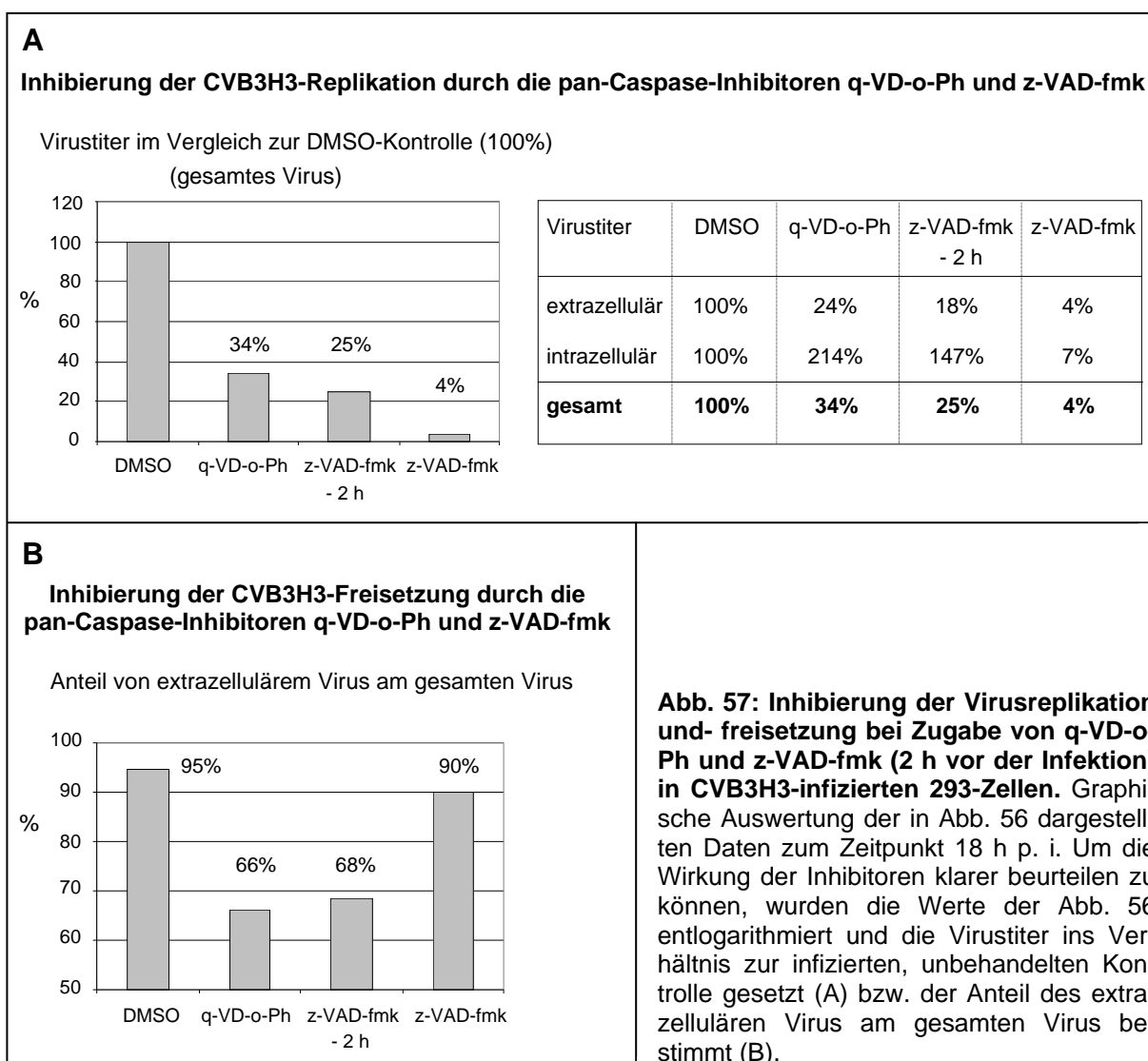


Abb. 57: Inhibierung der Virusreplikation und- freisetzung bei Zugabe von q-VD-o-Ph und z-VAD-fmk (2 h vor der Infektion) in CVB3H3-infizierten 293-Zellen. Graphische Auswertung der in Abb. 56 dargestellten Daten zum Zeitpunkt 18 h p. i. Um die Wirkung der Inhibitoren klarer beurteilen zu können, wurden die Werte der Abb. 56 entlogarithmiert und die Virustiter ins Verhältnis zur infizierten, unbehandelten Kontrolle gesetzt (A) bzw. der Anteil des extrazellulären Virus am gesamten Virus bestimmt (B).

4.5.3. Beeinflussung der Zellvitalität durch q-VD-o-Ph

Um beurteilen zu können, inwieweit apoptotische Prozesse während der CVB3H3-Infektion eine Bedeutung bei der Ausprägung des ZPE und der Zellvitalität besitzen, wurde der Anteil lebender Zellen mit Hilfe der Trypanblaufärbung bestimmt. Dabei war kein Unterschied bei infizierten, q-VD-o-Ph-behandelten Zellen im Vergleich zu infizierten Kulturen ohne Inhibitor feststellbar, in beiden Fällen wurde ein deutlicher Abfall der Zellvitalität zwischen 10 und 16 h

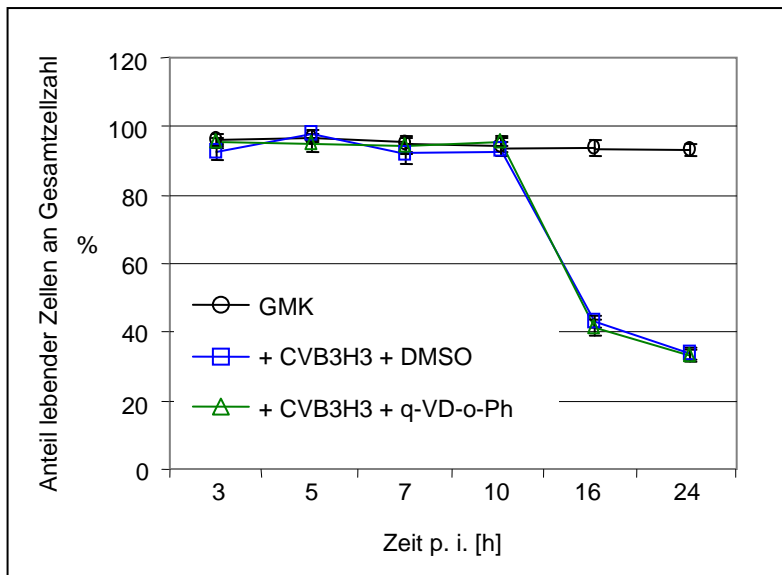


Abb. 58: Fehlender Einfluss des pan-Caspase-Inhibitors q-VD-o-Ph auf die Zellvitalität bei der Infektion von GMK-Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 2,5). Zeitgleich mit der Infektion wurde q-VD-o-Ph (50 μ M) bzw. DMSO zugegeben und zu den angegebenen Zeitpunkten der Anteil lebender Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD aus jeweils 3 Proben/Zeitpunkt.

p. i. beobachtet (Abb. 58). Auch bei der Ausbildung des ZPE, sowohl hinsichtlich des Zeitpunktes seines Auftretens als auch dem Grad der Ausprägung, hatte die Zugabe von q-VD-o-Ph keine Wirkung (nicht dargestellt). Das lässt darauf schließen, dass an der Zytopenogenität von CVB3H3 keine Caspase-abhängigen Aktivitäten beteiligt sind, sondern dass sie davon unabhängig durch die Replikation der Viren bedingt ist. Der wesentliche

Faktor für die zellschädigenden Eigenschaften von Picnaviren ist also in der Aktivität der viralen Proteasen und deren Abbau vieler zellulärer Proteine zu sehen. Die fehlende Wirkung von q-VD-o-Ph auf die Zellvitalität steht im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen, da zum einen die Aktivität der 2A- und 3C-Protease von CVB3H3 nicht beeinträchtigt wird. Zum anderen zeigt sich der Einfluss der Apoptose-Inhibition auf den Virustiter erst zum Ende des Replikationszykluses, so dass die bis dahin gebildeten Viren bzw. viralen Proteasen für die Entfaltung der Zytopenogenität verantwortlich sind.

4.5.4. Effekt von q-VD-o-Ph auf die Freisetzung von Cyt C

Um die Beteiligung von Caspasen an der Virus-induzierten Translokation von Cyt C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma zu beurteilen, wurden 293-Zellen in Anwesenheit von q-VD-o-Ph mit CVB3H3 infiziert und die Verteilung des Cyt C in den Zellfraktionen zu verschiedenen Zeiten untersucht. Dabei war zu sehen, dass 7 h p. i. die Freisetzung des Cyt C ins Zytoplasma durch die Inhibierung der Caspase-Aktivitäten gegenüber Virus-infizierten Zellen ohne Inhibitor verzögert wurde (Abb. 59). Eine densitometrische Auswertung zeigte, dass sich in der DMSO-Kontrolle ~23% des zellulären Cyt C im Zytoplasma befand, während dies bei q-VD-o-Ph-Zugabe nur ~14% waren, was einer Verringerung von 40% entsprach. Diese Verzögerung fand jedoch nur in der Anfangsphase der Cyt C-Translokation statt, da 16 h p. i. keine reduzierte Freisetzung mehr erkennbar war. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass

Caspase-Aktivitäten einen Anteil an der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran haben, insbesondere in der Anfangsphase der Infektion. Caspase-unabhängige intrazelluläre Signale, die durch die Replikation von CVB3H3 induziert werden, gewinnen jedoch im weiteren Verlauf der Infektion hinsichtlich der Freisetzung von Cyt C zunehmend an Bedeutung.

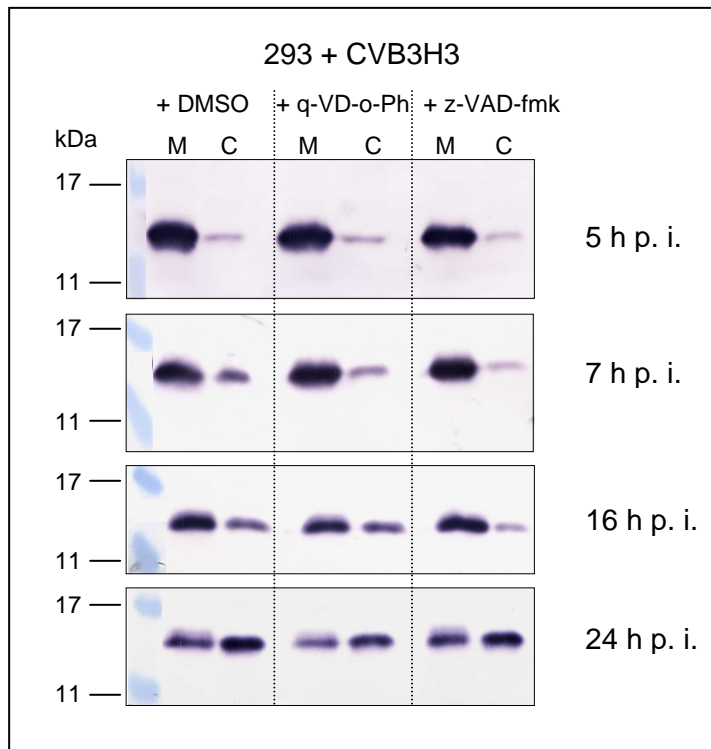


Abb. 59: Verzögerte Freisetzung von Cyt C bei der Zugabe von q-VD-o-Ph im Vergleich zu unbehandelten CVB3H3-infizierten Zellen. 293-Zellen wurden infiziert (m.o.i. 2,5) und gleichzeitig mit den pan-Caspase-Inhibitoren (50 μ M) bzw. DMSO versetzt. Je 30 μ g (5 und 7 h p. i.) bzw. 25 μ g (16 und 24 h p. i.) Protein wurden auf 12,5%-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. M: mitochondriale Fraktion; C: zytosolische Fraktion

Coxsackieviren B zählen neben den Polio- und Hepatitis A-Viren zu den bedeutendsten humanen Krankheitserregern innerhalb der Picornaviren, insbesondere durch ihre maßgebliche Beteiligung an der Entstehung akuter und chronischer Herzmuskelerkrankungen. Trotz intensiver Forschung und der Identifizierung verschiedener Pathomechanismen, die darauf hinweisen, dass sowohl virusbedingte Schädigungen der Kardiomyozyten als auch virusinduzierte Immunreaktionen an dem Krankheitsprozess beteiligt sind, ist die Pathogenese der coxsackieviralen Herzerkrankung bislang weitgehend unklar und präventive oder spezifische therapeutische Maßnahmen sind nicht etabliert. Für eine effektive Behandlung und die Kontrolle dieser Viren ist ein detailliertes Verständnis der Virus-Wirt-Interaktionen erforderlich.

Neben den direkten viralen und immunologischen Schäden stellt die durch die CVB3-Infektion induzierte Apoptose einen weiteren Aspekt der Erkrankung dar. Sowohl beim Menschen als auch im murinen Modell wurden Apoptose-bedingte Zellveränderungen im Herzgewebe nachgewiesen [138, 40, 73, 74]. Eingehendere Untersuchungen von Henke et al. (2001) zeigten, dass die Pathogenität von CVB3H3 mit seiner Fähigkeit zur Apoptose-Induktion in Zusammenhang steht [75].

Grundlage dieser Arbeiten war die Suche nach Interaktionen zwischen viralen und Wirtszellproteinen, bei der im Hefe-Zweihybrid-System die Wechselwirkung zwischen dem viralen VP2-Kapsidprotein und dem proapoptotischen Siva-Protein gefunden wurde [74]. Eine Variante des CVB3H3-Wildtyps (CVB3H310A1) unterscheidet sich von diesem nur durch die Substitution einer Aminosäure, die sich im VP2-Protein befindet (N>D165) [97]. Damit gehen eine geringere Kardiotropie von CVB3H310A1 und eine unterschiedliche Induktion zellulärer Immunantworten im Mausmodell einher [114, 83]. *In vitro*-Untersuchungen mit dem VP2H310A1-Protein ergaben, dass es nicht fähig war, effizient mit Siva zu interagieren. Weiterhin zeigte der Vergleich von CVB3H3- und CVB3H310A1-infizierten Mäusen, dass nur der Wildtyp die Transkription von *siva* induzierte, womit eine stärkere Zerstörung von Pankreas-Gewebe, Induktion der Apoptose und Ausbreitung des Virus zu sekundären Organen verbunden waren [74, 75].

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden in der vorliegenden Arbeit die apoptotischen Prozesse und deren Bedeutung im Verlauf einer CVB3-Infektion eingehender im Zellsystem analysiert, unabhängig von den komplexen Faktoren, die eine Virusinfektion im Mausmodell beeinflussen können. Zu Beginn der Untersuchungen bereits veröffentlichte Daten hinsichtlich des Auftretens apoptotischer Zellveränderungen bei Enterovirusinfektionen zeigten, dass sowohl die Replikation von Polio- als auch von Coxsackieviren mit einer Induktion von Apoptose verbunden war [113, 30]. Außerdem war es möglich, durch die alleinige Expression der beiden viralen Proteasen 2A und 3C von PV ihre Apoptose-induzierende Funktion zu belegen [14, 67]. Nachgewiesen wurden die Prozesse anhand des Auftretens apoptotischer Marker in Form der Aktivierung der Caspase-3 und der

Kondensierung und Fragmentierung des Chromatins. Dies waren erste Anhaltspunkte dafür, dass das Absterben von Enterovirus-infizierten Zellen auf komplexere Weise reguliert werden kann als durch die bloße Lyse in Form der Plasmamembran-Zerstörung infolge des ZPE. Erweitert wurde dies durch Arbeiten, die zeigten, dass es im Verlauf von produktiven PV-Infektionen auch zur aktiven Unterdrückung der Apoptose kommen kann, während bei einer abortiven Infektion (durch die Inhibierung der viralen RNA-Replikation nach Zugabe von GuHCl) Apoptose induziert wurde [199]. Eine nähere Analyse zeigte, dass es bei diesen Experimenten in der Mitte des Replikationszyklus zu einer Umstellung der Expression von einer frühen proapoptotischen auf eine antiapoptotische Funktion kam, die den apoptotischen Zelltod unterdrückte [4]. Trotz fehlender Details – sowohl hinsichtlich der Signalwege, die an der Induktion der Enterovirus-induzierten Apoptose beteiligt sind, als auch der Natur der antiapoptotischen Aktivität des PV – wiesen diese Arbeiten auf die Beteiligung eines komplexen Zusammenspiels Apoptose-modulierender Funktionen an der Pathogenese dieser Viren hin.

5.1. Induktion der Apoptose durch CVB3H3 und CVB3H310A1 *in vitro*

5.1.1. Veränderungen der nukleären Morphologie

Nach der Infektion von 293-Zellen mit den Virusvarianten CVB3H3 bzw. CVB3H310A1 wurden diese auf Anzeichen Apoptose-bedingter Zellveränderungen untersucht. Besonders ausgeprägte morphologische Umformungen während des programmierten Zelltods betreffen den Kern und können durch das Anfärben der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Dabei ist eine Verdichtung des Chromatins zu beobachten, die sich von den auftretenden Veränderungen während des ZPE unterscheidet. Dort werden relativ früh im Verlauf der Infektion Deformationen des Zellkerns beobachtet, auch sind verschiedene Stufen von kondensiertem Chromatin, das an der Kernmembran haften bleibt, erkennbar, wobei den Rand des Kerns eine Schicht des am stärksten verdichteten Materials säumt. Im Gegensatz dazu löst sich während der Apoptose das stark und einheitlich kondensierte Chromatin von der Kernmembran und erscheint als deutlicher runder Fleck, der asymmetrisch an einem Rand des Zellkerns liegt. Außerdem kann in den späten Stadien der Apoptose eine Fragmentierung der Zellkerne in mehrere runde Partikel beobachtet werden [199, 3]. Wie die Abbildungen 27 und 28 deutlich zeigen, können den im Verlauf der CVB3H3-Infektion zunehmenden morphologischen Veränderungen des Zellkerns apoptotische Prozesse zugrunde gelegt werden. Neben der starken, einheitlichen und von der Kernmembran losgelösten Chromatinkondensierung war 26 h p. i. auch die Fragmen-

tierung einzelner Zellkerne zu erkennen. Dieses Bild war bei CVB3H310A1-infizierten Zellen weniger stark ausgeprägt; obwohl auch hier 26 h nach Infektion Zellkerne mit apoptotischer Morphologie nachgewiesen wurden, war ihr Anteil niedriger. Nichtsdestotrotz traten ebenfalls fragmentierte Kerne auf, die deutlich auf die Induktion apoptotischer Prozesse hinwiesen. Neben diesen mikroskopisch erkennbaren nukleären Veränderungen erfolgen weitere Schädigungen der genomischen DNA-Integrität. Unabhängig von der Verdichtung des Chromatins kommt es im Verlauf der Apoptose zum Abbau der DNA, wobei zwischen einer hochmolekularen Fragmentierung in 50-300 kb und einer weiterführenden zu Oligo- und Mononukleosomen (180_n bp) unterschieden werden kann, die auch als „DNA laddering“ bezeichnet wird [24]. Das „Laddering“ zählt durch seine charakteristische Darstellung im Agarosegel zu den „typischen“ Zeichen der Apoptose, ist aber ein sehr spätes Ereignis und, abhängig vom experimentellen System, nicht immer zu beobachten [39, 136]. Für beide Abbauformen wurde als zugrundeliegende Aktivität die der DNase „CAD“ (auch als „DFF-40“ bezeichnet) nachgewiesen. Dieses Enzym liegt im Zytoplasma durch die Bindung des Inhibitors „ICAD“ (oder „DFF-45“) als inaktive Form vor. Durch die Aktivität der Caspase-3 wird ICAD gespalten, wodurch das Kernlokalisierungssignal der DNase zugänglich wird und diese in den Kern wandern kann [112, 59, 163]. Dort erfolgt zunächst die Spaltung an den leichter zugänglichen Regionen des Chromatins, wo dieses periodisch mit der Kernlamina verbunden ist, so dass Schleifen mit einer Länge von 30-50 kb ausgebildet werden. Dieser Abbau führt zu den hochmolekularen Fragmenten und zu einer Auflösung der Chromatinstruktur, die den Zugang von CAD zu den Nukleosomen und die dortige Spaltung ermöglicht [143, 58, 164]. Bei der Analyse chromosomaler DNA, die aus 293-Zellen 34 h nach der Infektion mit CVB3H3 isoliert wurde, war es möglich, im Agarosegel oligonukleosomale Fragmente nachzuweisen, die ein klares Anzeichen für vorangegangene apoptotische Prozesse darstellten (Abb. 29). Im Vergleich dazu waren entsprechende Fragmente bei der CVB3H310A1-Infektion zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar. Nur die im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle reduzierte Größe der hochmolekularen DNA lieferte einen Hinweis auf Chromatin-degradierende Vorgänge. Dass auch CVB3H310A1-Viren ein oligonukleosomales Laddering induzieren können, zeigte aber die Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt (Abb. 29B).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl in CVB3H3- als auch CVB3H310A1-infizierten Zellen *in vitro* typische apoptotische Veränderungen der Zellkerne in Form von Chromatinkondensierung und -fragmentierung sowie das „DNA-Laddering“ beobachtet werden konnten. Das zeitverzögerte Auftreten dieser Prozesse bei Verwendung der CVB3H310A1-Variante deutet eher auf eine geringere Effizienz als auf ein qualitatives Unvermögen zur Apoptoseinduktion im Vergleich zu CVB3H3.

5.1.2. Nachweis verschiedener Caspase-Aktivitäten

Die Caspase-Aktivierung in Form der proteolytischen Kaskade wird nicht bei anderen pathologischen Prozessen beobachtet, sondern ist ein exklusives Merkmal des apoptotischen Programms. Durch ihre Funktion als bedeutendste Effektor-Caspase, die für den überwiegenden Teil der Substratspaltungen verantwortlich ist, besitzt die Detektion einer Caspase-3-Aktivität eine zentrale Bedeutung beim Nachweis von Apoptose. Für die Untersuchung der CVB3H3- bzw. CVB3H310A1-infizierten Zellextrakte wurden verschiedene Methoden verwendet. Zum einen konnte durch den direkten Nachweis der Caspase-3 mit Hilfe des Western Blots auf eine Prozessierung geschlossen werden, die am Abbau der inaktiven pro-Form erkennbar war (Abb. 31A). Dabei traten keine Unterschiede beim Vergleich der beiden Virusvarianten auf. Zum anderen wurde auf zweierlei Weise überprüft, inwieweit diese Prozessierung die Aktivierung der Caspase-3 zur Folge hatte. Lazebnik et al. wiesen 1994 nach, dass PARP [poly(ADP-ribose)-Polymerase] ein Substrat der aktivierten Caspase-3 ist. PARP ist ein hochkonserviertes, Chromatin-assoziiertes Protein, das sowohl für dessen strukturelle Modulierung wichtig ist [202] als auch für Reparatur- und Rekombinationsprozesse der DNA, indem es nach der Bindung an Strangbrüche verschiedene Proteine durch ADP-Ribosylierung modifiziert [216]. Die Detektion von PARP im Western Blot zeigte, dass bei CVB3H3- wie auch bei CVB3H310A1-Infektion die, für apoptotische Zellen typische, Spaltung des Proteins von 116 kDa zu einem 85 kDa-Fragment beobachtet werden konnte (Abb. 31B). Abermals waren dabei zeitliche Unterschiede ablesbar. Der Abbau von PARP in CVB3H3-infizierten Zellen ging dem in CVB3H310A1-infizierten voraus, so dass in ersteren 11 h p. i. ein größerer Anteil des Proteins bereits gespalten war. Auf ähnliche Weise können Caspase-Aktivitäten getestet werden, indem die Tetrapeptide der spezifischen Erkennungssequenzen an ein Chromophor gekoppelt werden, dessen Extinktion nach der Abspaltung gemessen werden kann und proportional der entsprechenden Caspase-Aktivität ist. Mit Hilfe dieses Tests konnte ebenfalls die Aktivierung der Caspase-3 in CVB3H3- und CVB3H310A1-infizierten Zellen nachgewiesen werden, deren Kinetik mit derjenigen der PARP-Prozessierung übereinstimmte. In Wildtyp-infizierten Zellen wurde ein Anstieg der Caspase-3-Aktivität zu einem früheren Zeitpunkt (bei 11 h p. i.) detektiert als bei Verwendung der CVB3H310A1-Viren. Von dieser zeitlichen Verzögerung abgesehen, war die maximal erreichte Aktivität jedoch vergleichbar (Abb. 30). Die Induktion der Apoptose wurde damit sowohl bei CVB3H3- als auch bei CVB3H310A1-Infektion *in vitro* eindeutig nachgewiesen. Dabei stieg die Caspase-3-Aktivität gegen Ende des Replikationszyklus an und erlangte ihre höchste Wirksamkeit 22 h p. i. – zu einem Zeitpunkt, als die Virusreplikation abgeschlossen war. Der maximale Virustiter wurde 12 h p. i. erreicht und verblieb auf diesem Niveau bis (mindestens) 24 h p. i. (Abb. 45). Diese Ergebnisse entsprechen denen einer Studie von Carthy et al. (1998) mit einer anderen Variante des CVB3-Virus und belegen, dass es

während der produktiven Infektion mit CVB3H3 und CVB3H310A1 zur Apoptose-Induktion kommt – im Gegensatz zu den Arbeiten von Vadim Agol und Kollegen oder von Campanella et al. (2004), bei denen nur abortive, nicht aber produktive Infektionen mit PV oder CVB3 mit apoptotischen Prozessen verbunden waren [199, 3, 28]. Zur weiteren Charakterisierung des Mechanismus der Caspase-3-Aktivierung während der CVB3-Infektion wurde untersucht, inwieweit eine Beteiligung der Initiator-Caspase-8 und/oder -9 nachweisbar war. Dafür wurden ebenfalls die colorimetrischen Aktivitätstests mit den Chromophor-gekoppelten Tetrapeptiden verwendet, die den Caspase-8- bzw. -9-spezifischen Erkennungssequenzen entsprachen. Mit dieser Methode gelang es jedoch nicht, initiale Aktivitäten nachzuweisen (Abb. 32). Erst bei Erreichen der maximalen Caspase-3-Aktivität wurde ein leicht erhöhter Umsatz sowohl des Caspase-8- als auch des Caspase-9-Substrats detektiert, der, wie Slee et al. (1999) zeigten, auf die Wirkung der Caspase-3 (in Form einer positiven Rückkopplung) zurückzuführen ist [180]. Die Experimente wurden unter Verwendung eines luminometrischen Testsystems wiederholt, aber auch diese sensitive Methode erbrachte keinen Nachweis einer Caspase-8- oder -9-Aktivität (Abb. 33). Deshalb erfolgte eine direkte Analyse der beiden Enzyme mit Hilfe des Western Blots, wodurch eine Prozessierung beider pro-Formen nachweisbar war (Abb. 34). Für die proteolytische Aktivierung der Initiator-Caspasen sind mehrere Spaltungen erforderlich, die zur Generierung der großen und kleinen Untereinheit für die Ausbildung des aktiven Heterotetramers notwendig sind. Im Falle der pro-Caspase-8 (p55) erfolgt die erste Spaltung C-terminal und führt zu einem p43/p41- und einem p12-Fragment, welches schnell zur aktiven p10-Unter-einheit konvertiert wird. Aus dem p43/p41-Zwischenprodukt entsteht durch eine weitere Spaltung die große p18-Untereinheit, wobei die p26/p24-Prodomäne (mit der „death effector domain“ DED) übrig bleibt [102]. Nach der CVB3H3-Infektion waren das p43/p41- sowie das p26/p24-Spaltprodukt ab 3 h p. i. bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion nachweisbar. Neben diesen relativ schwachen, aber für die Aktivierung spezifischen Signalen, führte die Virusinfektion zu einem stärkeren 33 kDa-Fragment der Caspase-8, dessen Bedeutung unklar ist. Es könnte zum einen aus einer abweichenden Prozessierung der Caspase-8 entstanden sein. Andererseits enthalten auch nicht infizierte GMK-Zellen geringe Mengen eines Proteins des gleichen Molekulargewichts. Für die Caspase-8 wurden bislang 8 verschiedene Isoformen beschrieben, die aus alternativen Spleißprozessen resultieren. Allerdings gelten nur die kompletten Caspase-8a- und -8b-Formen als proapoptotisch und werden in signifikanten Mengen auf Proteinebene in verschiedenen Zelllinien detektiert, die Funktionen der weiteren Isoformen bedürfen näherer Klärung [168]. Einige weisen Molekulargewichte von 30-32 kDa auf, so dass zumindest die Möglichkeit besteht, dass das unklare Fragment auf die verstärkte Expression einer Caspase-8-Isoform zurückzuführen ist. Die Aktivierung der pro-Caspase-9 (p46) führt über ein 35 kDa-Zwischenprodukt zu den aktiven Untereinheiten mit 18 und 10 kDa. Dieses p35-Intermediat wurde beginnend 3 h

nach Infektion mit CVB3H3 detektiert, ebenso wie ein 18 kDa-Fragment (Abb. 34). Nach Angaben des Herstellers des Anti-Caspase-9-Antikörpers (R&D Systems) tritt neben dem 35 kDa-Produkt ebenfalls ein weiteres Fragment von ~33 kDa auf, wie dies auch in der späten Phase der CVB3H3-Infektion detektiert wurde. Schwach erkennbar ist außerdem ein ~27 kDa großes Protein, das wahrscheinlich auch aus der Prozessierung der Caspase-9 in der Anfangsphase der Infektion entstand, da für diese bisher nur eine weitere Isoform (Caspase-9b) näher beschrieben wurde. Deren Funktion ist als antiapoptotisch einzuordnen, da sie kompetitiv die Bindung der kompletten Caspase-9 an Apaf-1 inhibieren kann, jedoch der überwiegende Teil der großen Untereinheit (mit dem katalytischen Zentrum) nicht vorhanden ist [184]. Ihr Molekulargewicht beträgt 31 kDa und lässt daher keinen Zusammenhang mit dem ~27 kDa-Fragment vermuten.

Um die CVB3H3-bedingte Caspase-Prozessierung weiter zu beurteilen, wurden Jurkat-Zellen verwendet, die häufig bei Apoptose-Studien eingesetzt werden, da sie zum einen durch die Expression von Todesrezeptoren den extrinsischen Signalweg unter Beteiligung der Caspase-8 stimulieren können. Zum anderen gehören sie zu den Typ II-Zellen, in denen die extrinsischen Signale über die Mitochondrien verstärkt werden und zu Cyt C-Freisetzung und Caspase-9-Aktivierung führen [168]. Zum Vergleich der Prozessierung wurden Jurkat-Zellen mit CVB3H3 infiziert bzw. Apoptose durch die Zugabe von Camptothecin oder anti-Fas-Antikörpern ausgelöst (Abb. 36 und 38A). Dabei war eine deutliche Übereinstimmung im Prozessierungsmuster zwischen virusbedingter und chemisch-induzierter Apoptose feststellbar. Deutlich erkennbar trat das spezifische 26 kDa-Spaltprodukt der Caspase-8 bei CVB3H3-Infektion und Zugabe von anti-Fas-Antikörpern bzw. Camptothecin auf. Schwach waren daneben in Virus- und Antikörper-behandelten Proben ~35- bzw. ~38 kDa-Fragmente zu sehen, die, hier stärker, auch bei Camptothecin-Behandlung detektiert wurden. Auch in Caspase-9 Western Blots war sowohl in infizierten als auch behandelten Jurkat-Zellen das spezifische 35 kDa-Zwischenprodukt nachweisbar. Während der CVB3H3-Infektion trat ein zusätzliches ~33 kDa-Fragment auf, welches auch bei Zugabe von anti-Fas-Antikörpern, neben einem weiteren ~26 kDa-Produkt, zu erkennen war. Da die zusätzlichen Caspase-Spaltprodukte sowohl in virusinfizierten wie auch in Substanz-behandelten apoptotischen Jurkat-Zellen zu beobachten waren, ist nicht anzunehmen, dass sie eine spezielle Bedeutung während der Virusinfektion oder eine regulatorische antiapoptotische Funktion besitzen. Die vergleichbare Prozessierung der Initiator-Caspasen zeigte sich auch bei der Analyse der Caspase-3, deren Aktivierung anhand des Auftretens der großen 17 kDa-Untereinheit sichtbar war. Im Vergleich zu GMK-Zellen scheint die Prozessierung der Caspasen in Jurkat-Zellen zeitlich verzögert stattzufinden. Als Erklärung dafür sind Unterschiede in der Infektion der beiden Zelllinien zu sehen. Wie Abbildung 35 zeigt, sind Jurkat-Zellen prinzipiell mit CVB3 infizierbar. Anhand der Synthese des viralen Kapsidproteins VP2 (Abb. 35B) ist jedoch ersichtlich, dass die Replikation in diesen Zellen

etwas verlangsamt scheint, da erst 8 h p. i. eine deutliche Zunahme dieses Proteins zu sehen ist. Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch die Detektion der prozessierten Caspase-8- und -9-Formen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Induktion der Apoptose zu einem ähnlich frühen Zeitpunkt im Verlauf des Replikationszyklus erfolgt wie das bei GMK- oder 293-Zellen der Fall ist.

Die Aktivität der in Jurkat-Zellen prozessierten Caspasen wurde mit Hilfe luminometrischer Tests überprüft (Abb. 37, 38B). Wie in GMK- und 293-Zellen war zwar der Nachweis aktiver Caspase-3 möglich, nicht jedoch von Caspase-8 oder -9. Auch bei Verwendung der Apoptose-Induktoren war zu den getesteten Zeiten keine (Camptothecin) bzw. eine nur schwach erhöhte (anti-Fas-Antikörper) Aktivität messbar. Eine Erklärung hierfür ist sicher in der unterschiedlichen Funktion der Caspasen als Initiatoren zu Beginn (Caspase-8, -9) bzw. als Effektor am Ende der proteolytischen Kaskade (Caspase-3) zu sehen. Während in Umfang und Dauer begrenzte Wirkungen der apikalen Caspasen ausreichen, um die Aktivierung nachgeschalteter Proteasen einzuleiten, ist für die Umsetzung des apoptotischen Programms eine längeranhaltende und ausgeprägtere Aktivität notwendig. Dies lässt sich auch aus den technischen Anleitungen der Tests erkennen, in der einer 30-fach erhöhten Caspase-3-Aktivität nur eine 2-fach bzw. 4-fach gesteigerte Caspase-9- bzw. -8-Aktivität gegenübersteht (Promega „Technical Bulletin“ „Caspase-Glo®-Assays“), wobei davon ausgegangen werden kann, dass optimale Protokolle zur chemisch-induzierten Apoptose verwendet wurden. Unter den experimentellen Bedingungen der vorliegenden Arbeit war maximal eine 10-fache Steigerung der Caspase-3-Aktivität (bei Camptothecin-Zugabe) messbar, so dass sich die im Verhältnis geringere Aktivität der Caspase-8 bzw. -9 nicht darstellen ließ. Nichtsdestotrotz sind beide Initiator-Caspasen bei der Aktivierung der Caspase-3 in CVB3H3-infizierten Zellen von Bedeutung, wie mit Hilfe der vergleichbaren Prozessierung von Caspase-8 und -9 in virusinduzierten und Chemikalien-behandelten Jurkat-Zellen im Western Blot gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die im Verlauf der CVB3H3-Infektion zunehmende Caspase-3-Aktivität ihre maximale Wirksamkeit am Ende des Replikationszyklus erreicht und eine frühzeitige Prozessierung der Initiator-Caspasen sowohl des extrinsischen als auch des intrinsischen Apoptosewegs nachweisbar war. Erstmals wurde damit eine initiale Beteiligung der Caspase-8 im Verlauf einer Enterovirus-induzierten Apoptose nachgewiesen. Die Arbeit von Carthy et al. (1998) zeigte lediglich die Aktivierung der Caspase-3 ohne Details hinsichtlich des CVB3-induzierten Apoptoseweges zu untersuchen [30]. Bisher gibt es eine weitere Veröffentlichung, in der eine Prozessierung der Caspase-8 während einer CVB3-Infektion nachgewiesen wurde, die jedoch der Aktivierung der Caspase-3 nachgeschaltet war und keinen Anteil an der initialen Induktion hatte [31].

5.1.3. Beteiligung des mitochondrialen und Bedeutung des extrinsischen Apoptosewegs während der CVB3-Infektion

Um die Aktivierung der Caspase-9 weiter zu charakterisieren, wurde die Freisetzung von Cyt C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma untersucht, die für die autokatalytische Aktivierung der Protease am Apoptosom unerlässlich ist. Dabei wurde gezeigt, dass im Verlauf der CVB3H3-Infektion eine zunehmende Translokation des Cyt C erfolgte, die im Western Blot ab 5 h p. i. nachweisbar war, so dass die Grundlage zur Initiation des mitochondrialen intrinsischen Apoptosewegs gegeben war (Abb. 39). Die geringe zeitliche Abweichung zwischen nachweisbarer Caspase-9-Prozessierung (bereits ab 3 h p. i.) und Cyt C-Freisetzung ist sicherlich den Versuchsbedingungen geschuldet, da zum einen für den Cyt C-Test zellfraktionierte Proben aus gesonderten Versuchen verwendet werden müssen und trotz gleicher experimenteller Vorgehensweise zwischen den Versuchen geringfügige zeitliche Verschiebungen auftreten. Zum anderen wurde die Prozessierung der Caspasen in GMK-Zellen untersucht, da sich dafür 293-Zellen aufgrund ausgeprägter Unspezifitäten der Antikörper als nicht geeignet erwiesen. Obwohl beide Zelllinien in gleicher Weise für die CVB3-Infektion geeignet sind, können geringe Abweichungen im Infektionsverlauf nicht ausgeschlossen werden. Auch bei Infektionen mit der CVB3H310A1-Virusvariante war eine effiziente Translokation von Cyt C ins Zytoplasma zu beobachten (nicht dargestellt). Die Beteiligung der Caspase-9 an der CVB3-induzierten Apoptose wurde auch von Carthy et al. (2003) belegt, wo ebenfalls eine Cyt C-Freisetzung zur proteolytischen Aktivierung der pro-Caspase-9 führte, die durch eine Überexpression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L inhibiert werden konnte [31]. Ebenso konnten neuere Untersuchungen mit Polioviren zeigen, dass sowohl apoptotische Prozesse, die unter experimentellen Bedingungen einer abortiven Infektion auftraten [15], als auch solche im Verlauf einer produktiven Infektion [157] mit der Freisetzung von Cyt C verbunden waren.

Weitere Hinweise hinsichtlich des Mechanismus CVB3H3-induzierter apoptotischer Zellveränderungen erbrachte die Auswertung eines cDNA-Arrays, mit dessen Hilfe die Expression Apoptose-relevanter Gene 8 h nach Infektion mit der von nicht infizierten 293-Zellen verglichen wurde (Abb. 40, Tab. 3). Auffallend war dabei die ~8-fach verstärkte Transkription des p53-Gens sowie der große Anteil an hochregulierten Genen mit Funktionen im Rezeptor-vermittelten extrinsischen Apoptoseweg. Die p53-vermittelte Apoptose verläuft Caspase-abhängig, wobei der Mechanismus ihrer Aktivierung von den experimentellen Bedingungen beeinflusst wird. Als hauptsächlich bedeutend wird dabei die p53-induzierte, Caspase-unabhängige Aktivierung des proapoptotischen Bcl-2 Proteins Bax gesehen, die in die Beteiligung des mitochondrialen Apoptosewegs und der Caspase-9 mündet [172]. Wie genau die Signalübertragung von p53 auf die Mitochondrien realisiert wird, ist noch nicht geklärt. Es wird angenommen, dass neben Bax weitere proapoptotische Bcl-2 Proteine von

Bedeutung sind, deren Aktivierung teils über die sequenzspezifische transaktivierende Funktion des p53 verläuft (z. B. Bax, Puma, Noxa) [137, 233]. Obwohl die genspezifischen Sequenzen von Puma und Noxa nicht auf der Array-Membran enthalten waren, scheint zumindest die Transaktivierung von *bax* während der CVB3H3-Infektion (zum analysierten Zeitpunkt) nicht von Bedeutung gewesen zu sein. Nichtsdestotrotz weist die erhöhte Transkription des p53-abhängigen Apaf-1-Gens auf eine mitochondriale Beteiligung mit nachfolgender Ausbildung des Apoptosoms während der CVB3-induzierten Apoptose hin. Neben weiteren p53-vermittelten proapoptotischen Funktionen (wie dem direkten Import des Proteins in die mitochondriale Matrix, verbunden mit der Bildung von ROS [117]) ist die Regulierung des extrinsischen Apoptosewegs von Bedeutung. Beschrieben wurden sowohl die transkriptionelle Aktivierung der Membranexpression verschiedener Todesrezeptoren wie Fas und DR5 [139, 220] als auch transkriptionsunabhängige Wirkungen. So vermittelte p53 den erhöhten Transport des Fas-Rezeptors vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran und induzierte die Bindung von Fas-FADD, was zu einer gesteigerten Sensitivität für die Fas-vermittelte Apoptose führte [16]. Auch eine p53-induzierte frühe, FADD-unabhängige Aktivierung der pro-Caspase-8 im Zytoplasma wurde beobachtet, die auf eine essentielle Rolle dieser Caspase im transkriptionsunabhängigen p53-Signalweg hinweist [51]. Angesichts der Bedeutung, die der extrinsische Apoptoseweg auch bei der p53-Signalübertragung besitzt, kann angenommen werden, dass zumindest ein Teil der Überexpression von Genen dieses Signalwegs während der CVB3H3-Infektion p53-kontrolliert erfolgte. Durch die mit Hilfe des Arrays nachgewiesene umfassende Aktivierung proapoptotischer Gene des extrinsischen Apoptosewegs werden die bisherigen Ergebnisse unterstützt, die eine Beteiligung dieses Signalwegs an der CVB3H3-induzierten Apoptose (pro-Caspase-8-Prozessierung) zeigen. Gleiches gilt auch für die erhöhte Transkription von Apaf-1, das mit der nachgewiesenen Cyt C-Freisetzung und pro-Caspase-9-Prozessierung für die gleichzeitige Mitwirkung des mitochondrialen Apoptosewegs spricht. Weiterhin lässt der Array eine Beteiligung von p53 an der Induktion der CVB3H3-verursachten Apoptose vermuten. Es kann spekuliert werden, inwieweit die Hochregulierung der p53-Transkription in Zusammenhang mit der Spaltung des p53-Proteins steht, die bei Polioviren beobachtet und auf die Funktion der viralen 3C-Protease zurückgeführt wurde. Im Gegensatz zu anderen Spaltungen dieser Protease war dabei ein weiterer, unbekannter zellulärer Faktor notwendig [216]. Wäre auch die coxsackievirale 3C-Protease in der Lage, p53 zu spalten, würde die erhöhte Transkription von *p53* dazu dienen, den Verlust auszugleichen und die weitere Funktion des Proteins zu gewährleisten. In Western Blot-Analysen konnte bis 12 h p. i. keine veränderte p53-Konzentration in CVB3H3-infizierten im Vergleich zu nicht infizierten Zellen detektiert werden (nicht dargestellt). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ein vermehrter proteolytischer Abbau durch die virale Protease mit einer gesteigerten Synthese ausgeglichen wird, da andernfalls eine erhöhte Proteinkonzentration in virusinfizierten Zellen

verglichen mit Kontrollzellen zu erwarten gewesen wäre. Grundsätzlich muss bei der Auswertung der Array-Daten beachtet werden, dass damit nur die Ebene der Transkriptionskontrolle analysiert wird und keine Berücksichtigung translationaler oder posttranslationaler Regulationsmechanismen möglich ist, die für die Stabilität und Aktivität vieler Proteine entscheidend sind. Hinzu kommt, dass die Expressionsanalyse nicht kontinuierlich erfolgt, sondern eine momentane Situation im Verlauf eines sich wandelnden, hochregulierten Signalwegs darstellt. In diesem Zusammenhang bietet das apoptotische Expressionsmuster CVB3H3-infizierter Zellen 8 h p. i. ein durchaus homogenes Bild, das durch die Überexpression weniger Gene (*dcR1*; *dcR2*; *traf1*; *traf2*), denen eine antiapoptotische Funktion zugeordnet werden muss, nicht gestört wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Beteiligung sowohl des extrinsischen als auch des intrinsischen Signalwegs an der CVB3-induzierten Apoptose zum einen durch die nachgewiesene hochregulierte Transkription relevanter Gene mittels Array-Technologie, zum anderen durch die Cyt C-Freisetzung belegbar war, wobei eine zentrale Rolle des p53-Proteins angenommen werden kann.

5.1.4. Unspezifische Inhibierung viraler Proteasen durch den pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk

Inwieweit die CVB3H3-induzierte Apoptose einen Einfluss auf die Replikation der Viren hat, sollte durch die Verwendung des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk untersucht werden, dessen Spezifität die irreversible Inaktivierung aller Caspasen ermöglicht. In Studien zur Untersuchung Caspase-abhängiger apoptotischer Prozesse werden Konzentrationen von 50-200 µM z-VAD-fmk eingesetzt, so dass in der vorliegenden Arbeit eine Endkonzentration von 50 µM verwendet wurde, die zur vollständigen Inhibierung der CVB3H3-induzierten Caspase-3-Aktivität bis zu 24 h p. i. ausreichte (Abb. 55). Bei Zugabe dieses Caspase-Inhibitors während der CVB3H3-Infektion war mikroskopisch eine deutliche Verzögerung des ZPE erkennbar, die bis 16 h p. i. mit einem erhöhten Anteil vitaler Zellen verbunden war (Abb. 41, 43). Gleichzeitig wurde durch z-VAD-fmk die CVB3H3-verursachte Cyt C-Freisetzung (beginnend bei 5 h p. i.) bis 16 h p. i. vollständig inhibiert und war erst nach 24 h Infektion nachweisbar (Abb. 44). Diese Effekte traten in gleicher Weise bei Infektionen mit der CVB3H310A1-Variante auf (nicht dargestellt). Diese Beobachtungen legen zwei Schlussfolgerungen nahe. Zum einen, dass die Initiation des mitochondrialen Apoptosewegs (über die Cyt C-Translokation) während der CVB3H3-Infektion Caspase-abhängig verläuft, was auf eine essentielle Rolle der Caspase-8 (über die Spaltung von Bid) in der CVB3H3-assoziierten Apoptose schließen lassen würde. Weiterhin wäre die Reduktion des ZPE und die erhöhte Lebensfähigkeit der infizierten Zellen durch z-VAD-fmk ein Hinweis auf die Beteiligung der Caspasen an der Ausbildung des ZPE. Zum anderen könnte neben diesen

direkten, Caspase-vermittelten Effekten die z-VAD-fmk-bedingte Inhibierung der Apoptose auch die Virusreplikation und darüber den ZPE und die Cyt C-Freisetzung beeinflussen.

Um dies zu klären, wurde die Viruskonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion in Anwesenheit des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk bestimmt, was eine vorübergehende Inhibierung der Virusreplikation – sowohl von CVB3H3 als auch von CVB3H310A1 – zur Folge hatte. Diese Hemmung war 12 h p. i. aufgehoben und der Virustiter vergleichbar mit dem in unbehandelten Kontrollen (Abb. 45). Nähere Untersuchungen dieser transienten, inhibierenden Wirkung ließen eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt der z-VAD-fmk-Zugabe erkennen, so dass bei einer Behandlung 3 h nach Infektion die Virusvermehrung bis 12 h p. i. vollständig verhindert werden konnte. Davon unabhängig war die Viruskonzentration 24 h p. i. in allen behandelten Proben mit der unbehandelten Kontrolle vergleichbar (Abb. 46). Dieser Effekt macht deutlich, dass die Beeinflussung des ZPE und der Cyt C-Translokation über die Inhibierung der Virusreplikation vermittelt wurde. Dies könnte einerseits auf die Hemmung der Caspasen und damit der Apoptose durch z-VAD-fmk zurückzuführen sein. Das würde wiederum nur für eine begrenzte Bedeutung apoptotischer Prozesse zu Beginn des Replikationszyklus sprechen, da eine Zugabe des Inhibitors zu späteren Zeitpunkten weniger Wirkung zeigte und am Versuchsende keine Unterschiede mehr erkennbar waren. Andererseits könnte z-VAD-fmk möglicherweise eine unmittelbare Wirkung auf das Virus haben, wofür die beschränkte Zeitdauer der Hemmung ein Hinweis wäre. Um dies zu klären, erfolgte eine genauere Analyse der z-VAD-fmk-Wirkung während der CVB3H3-Infektion.

Dafür wurde die Synthese viraler RNA-Kopien (in Plusstrang-Orientierung) untersucht, indem in Anwesenheit von z-VAD-fmk zu verschiedenen Zeiten die gesamte RNA isoliert und zelluläre mRNA sowie virale genomische RNA revers transkribiert wurden. Durch Vervielfältigung verschiedener virusspezifischer Sequenzen mittels herkömmlicher und real-time PCR konnte gezeigt werden, dass durch z-VAD-fmk die Synthese viraler RNA-Genome bis 12 h p. i. vollständig unterbunden wurde. Erst 24 h nach Infektion war ein Anstieg der cDNA-Kopien nachweisbar, deren Anzahl aber auch dort noch unter der von unbehandelten, infizierten Kontrollen lag (Abb. 47, 48). Diese deutliche Hemmung der CVB3H3-RNA-Synthese durch den Caspase-Inhibitor wirkte sich erwartungsgemäß auf die Bildung viraler Proteine aus. Im VP2-spezifischen Western Blot konnte erst 24 h p. i. ein deutliches Signal detektiert werden, das bei Abwesenheit von z-VAD-fmk in vergleichbarer Intensität schon 6 h p. i. nachweisbar war (Abb. 50).

Dieser ausgeprägte, aber trotzdem zeitlich begrenzte Effekt von z-VAD-fmk auf die Replikation von CVB3H3 deutete eine direkte Wirkung des Inhibitors auf das Virus an. Trotz der postulierten Spezifität von z-VAD-fmk zur irreversiblen Inaktivierung der Caspasen beschrieben Schotte et al. (1999) nicht-spezifische Effekte von Fluoromethylketon-Inhibitoren auf die lysosomale Protease Cathepsin B [170]. Sowohl z-VAD-fmk als auch z-DEVD-fmk (Caspase-

3-Inhibitor) führten zur vollständigen Hemmung der Cathepsin B-Aktivität schon bei Konzentrationen, die allgemein für Apoptose-Studien eingesetzt werden, obwohl die Protease nicht in der Lage war, ein entsprechendes Substrat (Ac-DEVD-AMC) zu spalten. Cathepsine besitzen – trotz unterschiedlicher Struktur und abweichendem Katalysemechanismus – wie die Caspasen ein Cystein im aktiven Zentrum. Dies trifft auch für die viralen Proteasen 2A und 3C zu, deren Struktur und Katalysemechanismus den Chymotrypsin-ähnlichen Serin-Proteasen gleicht, die aber abweichend von diesen statt des Serins ein Cystein im aktiven Zentrum aufweisen [174]. Trotz der unterschiedlichen aktiven Zentren von Caspasen (katalytische Cys-His-Dyade) und viralen Proteasen (katalytische Cys-His-Asp-Triade) wurde untersucht, ob eine unspezifische Inhibierung der 2A- oder 3C-Protease durch z-VAD-fmk als Ursache für die beobachteten Effekte in Frage kommt.

Wie nachgewiesen wurde, erfolgt in Enterovirus-infizierten Zellen die Spaltung des Poly(A)-bindenden Proteins PABP durch die viralen Proteasen [87, 93]. Die Spaltung von PABP innerhalb des C-Terminus trägt zum Abschalten des Zellstoffwechsels bei, da dieses Protein durch seine Bindung an den Poly(A)-Schwanz der mRNA's sowohl für die Initiation der Proteintranslation (durch die Wechselwirkung mit eIF4GI und die Zirkularisierung der mRNA sowie bei der Rekrutierung der ribosomalen 60S-Untereinheit) als auch für die Stabilität der mRNA von Bedeutung ist [101]. Für die *in vitro*-Spaltungstests der vorliegenden Arbeit wurde daher PABP als Substrat der beiden coxsackieviralen Proteasen 2A und 3C eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass z-VAD-fmk das Auftreten der charakteristischen PABP-Spaltprodukte verhinderte und damit sowohl die 2A- als auch die 3C-Protease gleichermaßen durch den pan-Caspase-Inhibitor unspezifisch inaktiviert wurden (Abb. 52). Dies lässt darauf schließen, dass während der CVB3-Infektion nach der anfänglichen Translation des Polyproteins dessen Prozessierung durch die 2A- und 3C-Protease in Anwesenheit von z-VAD-fmk verhindert wurde. Dadurch stand die für die virale RNA-Synthese essentielle RNA-abhängige RNA-Polymerase 3D nicht zur Verfügung, wodurch keine viralen Negativstrang- und Positivstrang-RNA-Moleküle gebildet werden konnten, was wiederum die virale Proteinsynthese beeinträchtigte. Damit muss die Interpretation der Bedeutung der z-VAD-fmk-Wirkung während der CVB3-Infektion revidiert werden. Die beobachtete Hemmung des ZPE sowie die Verzögerung des Zelltods und der Cyt C-Freisetzung ist in erster Linie durch die Inhibierung der Virusreplikation selbst und nicht durch eine Beteiligung der Caspasen an diesen Prozessen zu begründen.

Dass diese unspezifische Aktivität von z-VAD-fmk auf die viralen Proteasen nicht allein auf das coxsackievirale System beschränkt ist, zeigte eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Deszcz et al. (2004). Auch in dieser wurde bei der Untersuchung des humanen Rhinovirus 2 (HRV2) eine transiente Reduktion des Virustiters sowohl durch z-VAD-fmk als auch z-IETD-fmk (Caspase-8-Inhibitor) detektiert [48]. Diese Wirkung konnte auf die Inaktivierung der rhinoviralen 2A-Protease zurückgeführt werden, die in Anwesenheit der Caspase-Inhibitoren

nicht mehr zur Spaltung des Substrats eIF4GI in der Lage war. Die Arbeitsgruppe fand auch die Erklärung für die Ursache der Unspezifität sowie für deren zeitliche Begrenzung. Um die Zellpermeabilität der Inhibitoren zu erhöhen, besitzen sie verschiedene Modifikationen wie die N-terminale Benzyloxycarbonyl-Gruppe (-z-). Zusätzlich ist der Aspartat-Rest der Peptid-Inhibitoren methyliert. Für die *in vitro*-Spaltungstests wurde neben z-VAD-fmk auch dessen nicht methylierte Form verwendet und festgestellt, dass diese keine inhibierende Wirkung auf die 2A-Aktivität mehr besaß. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Methylierung des Aspartatrests (durch die Maskierung der negativen Ladung) den Eintritt der Inhibitoren in die Substratbindungstasche der viralen Protease erlaubte. Diese weist zwar nur geringe sterische Beschränkungen auf, toleriert aber aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen keine negativ geladenen Aminosäuren an der P1-Position, wie sie im Fall des nicht methylierten Inhibitors vorliegt. Die transiente Wirkung des methylierten Caspase-Inhibitors wird mit dessen intrazellulärer Demethylierung durch endogene Esterasen erklärt, wodurch die unspezifische Bindung an die viralen Proteasen verhindert wird.

Diese Befunde sollten bei der Interpretation von Ergebnissen, die bei Einsatz von z-VAD-fmk oder ähnlichen Inhibitoren in Apoptose-Studien erhalten werden, Berücksichtigung finden. Bei der Analyse der Ergebnisse kommen Unterschiede zwischen verschiedenen experimentellen Systemen erschwerend hinzu. So ist anzunehmen, dass die Kinetik der Demethylierung sich in den verschiedenen Zellen und Geweben unterscheidet. Auch ist unklar, inwieweit trotz der Konservierung der picornaviralen Proteasen Unterschiede bezüglich ihrer Bindung methylierter Caspase-Inhibitoren bestehen. In einer Arbeit von Zamora et al. (2002) trat in einem *in vitro*-Spaltungstest in Anwesenheit von z-VAD-fmk keine Hemmung der eIF4GI-Spaltung durch die 2A-Protease von Poliovirus auf [234]. Es wird jedoch nicht ersichtlich, ob dabei die methylierte oder nicht methylierte Form des Inhibitors eingesetzt wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die reduzierte Zytopathogenität und verzögerte Cyt C-Freisetzung, die in CVB3H3-infizierten Zellen bei Zugabe des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk zu beobachten war, durch die Inhibierung der Virusreplikation verursacht wurde. Diese resultierte aus der transienten, unspezifischen Inaktivierung der viralen Proteasen 2A und 3C durch z-VAD-fmk, was zur Hemmung der viralen RNA- und Proteinsynthese führte. Die Hemmung der Virusreplikation durch z-VAD-fmk stellt einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Entwicklung therapeutischer Verfahren dar.

5.1.5. Wirkung des pan-Caspase Inhibitors q-VD-o-Ph

Es wurde überprüft, ob der Methylierungsstatus von z-VAD-fmk wie bei HRV2 [48] auch bei CVB3H3 für die unspezifische Hemmung der viralen Proteasen verantwortlich war. Dazu erfolgte zum einen die Zugabe von z-VAD-fmk bereits 2 h vor der CVB3H3-Infektion, um die Demethylierung des Inhibitors durch zelluläre Esterasen zu ermöglichen. Zum anderen

wurde ein neuer, irreversibler Inhibitor eingesetzt (q-VD-o-Ph), der ebenfalls alle apoptotischen Caspasen inaktivieren kann, aber andere Modifikationen zur Erhöhung der Zellpermeabilität besitzt. Der N-Terminus trägt eine Chinolin-, der C-Terminus eine Phenylgruppe und die Seitenkette des Aspartat-Rests liegt nicht methyliert vor. Bei der Infektion von 293-Zellen mit dem rekombinanten Virus CVB3H3/EGFP zeigte sich, dass in Anwesenheit von q-VD-o-Ph bzw. vorinkubiertem z-VAD-fmk die Synthese des EGFP nicht mehr beeinträchtigt war. Wohingegen in der Kontrolle, in der z-VAD-fmk erst zum Zeitpunkt der Infektion zugegeben wurde, keine grün fluoreszierenden Zellen nachweisbar waren (Abb. 53). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die nicht methylierten Caspase-Inhibitoren die 3C-Protease nicht länger hemmten, da durch deren Aktivität das EGFP aus dem Polyprotein freigesetzt wird (und keine starke Fluoreszenz der Fusion aus EGFP und Polyprotein zu erwarten war). Bestätigt wurde das Resultat durch *in vitro*-Spaltungstests, bei denen der Abbau von PABP sowohl durch die 2A- als auch durch die 3C-Protease selbst bei sehr hohen Konzentration von q-VD-o-Ph nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 54). Damit konnte gezeigt werden, dass auch bei den coxsackieviralen Proteasen der Methylierungsstatus des Aspartats in der P1-Position die Ursache für die unspezifische Bindung der Caspase-Inhibitoren darstellt.

Der Einfluss apoptotischer Zellveränderungen auf die Virusreplikation von CVB3H3 wurde daher unabhängig von unspezifischen Effekten erneut untersucht. Dafür wurden wiederum sowohl z-VAD-fmk (2 h vor der Infektion) als auch q-VD-o-Ph verwendet und für eine genauere Analyse bei der Bestimmung des Virustiters zwischen extra- und intrazellulärem Virus unterschieden (Abb. 56). Das Ergebnis zeigte, dass durch die nicht methylierten Caspase-Inhibitoren die Virusreplikation 18 h p. i. beeinflusst wurde. Deutlich war dabei erkennbar, dass bei vorliegender Hemmung der Caspase-Aktivitäten die extrazelluläre Viruskonzentration im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt war, der intrazelluläre Virustiter sich dagegen erhöhte, so dass auf eine inhibierte Freisetzung der Nachkommenviren geschlossen werden konnte. Eine genauere Auswertung der Daten (Abb. 57) verdeutlichte, dass sich bei der ungehemmten Virusreplikation 95% der Viren extrazellulär nachweisen ließen, während dieser Anteil in den inhibierten Proben nur noch bei 66% (q-VD-o-Ph) bzw. 68% (z-VAD-fmk) lag. Von diesem Einfluss auf die Freisetzung der Viren abgesehen, war eine zusätzliche Wirkung auf die Viruskonzentration selbst erkennbar. Trotz des (geringfügig) höheren intrazellulären Titers wird bei der Betrachtung der gesamten Viruskonzentration (aus extra- und intrazellulärem Titer) ersichtlich, dass die Virusvermehrung deutlich gehemmt war. In Anwesenheit nicht methylierter pan-Caspase-Inhibitoren wurde nur ein Drittel (q-VD-o-Ph) bzw. ein Viertel (z-VAD-fmk) der Viren gebildet wie in nicht behandelten Kontrollen.

Die Zugabe von z-VAD-fmk zeitgleich zur CVB3H3-Infektion diente zur Kontrolle und verdeutlichte die unterschiedliche Wirkung der methylierten bzw. nicht methylierten Form von z-VAD-fmk auf die Virusreplikation. Erwartungsgemäß bedingte die unspezifische Wirkung von z-VAD-fmk auf die viralen Proteasen ohne Vorinkubation auch 18 h p. i. noch eine

erhebliche Beeinträchtigung der CVB3H3-Replikation. Die intrazelluläre Viruskonzentration erreichte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur 7%, im Gegensatz zur nicht methylierten z-VAD-fmk-Form (147%) (Abb. 57A). Diese gehemmte Virusneusynthese erklärt den hohen Anteil an extrazellulärem Virus (90%) (Abb. 57B).

Im Gegensatz zu der ausgeprägten Wirkung 18 h p. i. war zu einem früheren Zeitpunkt im Verlauf des Replikationszyklus (7 h p. i.) noch kein Einfluss von q-VD-o-Ph auf die Viruskonzentration zu erkennen, während die Wirkung von z-VAD-fmk zu diesem Zeitpunkt auf eine offenbar noch nicht vollständige Demethylierung des Inhibitors zurückgeführt werden kann. Der fehlende Effekt von q-VD-o-Ph 7 h p. i. ist insofern nicht unerwartet, da er zeitlich mit den nachgewiesenen apoptotischen Prozessen übereinstimmt. Die Cyt C-Freisetzung beginnt zwischen 5 h und 7 h p. i., während ein Nachweis der aktiven Effektor-Caspase-3 in Spaltungstests ab 10-11 h p. i. möglich ist. Daher ist auch erst ab dieser Zeit mit einer Wirkung der Caspase-Inhibitoren zu rechnen und der Virustiter bei 7 h p. i. noch unbeeinträchtigt.

In Abweichung zu diesen Ergebnissen bezüglich der Hemmung der Virusvermehrung fällt auf, dass in den anfänglichen Experimenten bei Verwendung von z-VAD-fmk und der Bestimmung des gesamten Virustiters (ohne Trennung in extra- und intrazellulär) am Versuchsende keine erniedrigte Viruskonzentration festgestellt werden konnte (Abb. 46). Wie Abbildung 55 zeigt, war trotz der unspezifischen Inhibition der viralen Proteasen in diesen Proben 24 h p. i. ebenfalls keine Caspase-3-Aktivität nachweisbar. Durch die fehlende Kenntnis über den zeitlichen Verlauf der Demethylierung ist jedoch nicht klar, ob die Hemmung der Caspase-Aktivitäten zum gleichen Zeitpunkt wie bei der Verwendung des spezifischen q-VD-o-Ph oder aber verspätet begann durch eine bevorzugte Bindung an die (ständig neu synthetisierten) Proteasen innerhalb des viralen Polyproteins. Dennoch wäre damit der Unterschied zwischen den Resultaten mit vorinkubiertem z-VAD-fmk in der Abb. 46 (Gesamtiter) und Abb. 56 nicht zu erklären. Derzeitige Versuche *in vitro* sowie im Mausmodell unter Verwendung von z-VAD-fmk und q-VD-o-Ph bestätigen jedoch die Ergebnisse einer reduzierten Freisetzung und eines verringerten Virustiters bei der Analyse von extra- und intrazellulärer Viruskonzentration in B-Lymphozyten.

Inwieweit die CVB3-induzierte Cyt C-Translokation von vorgeschalteten Caspase-Aktivitäten abhängig ist, wurde ebenfalls mit Hilfe von q-VD-o-Ph untersucht. Dabei trat im Vergleich zur DMSO-Kontrolle 7 h p. i. eine Verzögerung der Cyt C-Freisetzung auf, so dass durch die Zugabe von q-VD-o-Ph der Anteil des zytoplasmatisch lokalisierten Proteins um 40% reduziert wurde. Diese Hemmung war jedoch zeitlich begrenzt und 16 h p. i. nicht mehr nachweisbar (Abb. 59). Damit scheint an der initialen Freisetzung des Cyt C eine Caspase-Aktivität, höchstwahrscheinlich in Form der Caspase-8-vermittelten Prozessierung von Bid zu tBid und der daraus resultierenden Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, beteiligt zu sein. Im Verlauf der Virusreplikation verliert dies jedoch an Bedeutung und eine

Inhibierung der Caspasen wirkt sich nicht mehr auf die Freisetzung des Cyt C aus. In dieser Phase könnte die Funktion des p53-Proteins zum Tragen kommen, dessen Transkription 8 h p. i. deutlich verstärkt war und das in der Lage ist, Caspase-unabhängig Bax zu aktivieren und damit den mitochondrialen Apoptoseweg zu induzieren [172]. Auch andere proapoptotische p53-Funktionen wie der Anstieg der reaktiven Sauerstoff-Radikale (ROS) in der mitochondrialen Matrix könnten eine Rolle spielen [117]. Ebenso kann eine Beteiligung der Caspase-2, bei deren Aktivierung als Initiator-Caspase ebenfalls p53 beteiligt ist, an der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran nicht ganz ausgeschlossen werden, da diese Caspase ebenfalls Bid spalten kann und zumindest durch z-VAD-fmk kaum inhibiert wird. Ob diese mangelnde Sensitivität auch für q-VD-o-Ph gilt ist unklar.

Im Gegensatz zu diesen nachweisbaren Wirkungen die q-VD-o-Ph während der CVB3H3-Replikation besaß, konnte hinsichtlich des ZPE und der damit korrelierenden Zellvitalität kein Einfluss festgestellt werden (Abb. 58). Dies zeigt, dass diese Vorgänge durch die Virusreplikation und die Wirkung viraler Proteasen direkt verursacht wurden und Caspase-Aktivitäten keinen Anteil daran hatten. Der Verlauf dieser morphologischen Zellveränderungen und ihr Einfluss auf die Zellvitalität war abhängig vom zellulären System und in 293-Zellen mikroskopisch zu einem früheren Zeitpunkt zu beobachten als in GMK-Zellen, während der Zeitpunkt nachweisbarer Caspase-3-Aktivität in beiden Zelllinien gleich war. Für die morphologisch sichtbare Ausprägung des ZPE war außerdem eine gewisse Zeitspanne erforderlich. Die zu Beginn der Replikation durch methyliertes z-VAD-fmk inhibierte Synthese viraler Proteasen und deren fehlende Aktivität war noch 12 h p. i. mikroskopisch nachweisbar (Abb. 41), obwohl zu diesem Zeitpunkt schon keine Unterschiede mehr im Virustiter existierten (Abb. 45A). Gleiches gilt für die Zellvitalität, die selbst 16 h p. i. noch deutlich erhöht war (Abb. 43). Das bedingt umgekehrt auch den fehlenden Einfluss von q-VD-o-Ph auf den ZPE und die Zellvitalität, da sich die zu Beginn des Replikationszyklus unbeeinträchtigte Synthese viraler Proteasen später in der entsprechenden Ausprägung des ZPE zeigte, obwohl dann unterschiedliche Virustiter vorlagen.

Die Literatur zeigt, dass die Beziehung zwischen CVB3-Infektion und Apoptose-Induktion ebenfalls von Carthy et al. (2003) eingehend untersucht wurde, wobei HeLa Zellen und eine andere CVB3-Variante (m.o.i. 10) verwendet wurden. Dabei konnte im Western Blot eine Prozessierung der pro-Caspase-9, die jener der pro-Caspase-3 vorausging, detektiert werden. Prozessierte Formen der pro-Caspase-2 und -8 waren zeitgleich mit denen der pro-Caspase-3 zu erkennen. Eine Inhibierung der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran durch die Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-x_L hemmte die Prozessierung der pro-Caspase-9, -2, -8 und -3. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Caspase-9 als Initiator-Caspase des intrinsischen Apoptosewegs die entscheidende Funktion besaß und die Prozessierung der anderen Caspasen (auch der extrinsischen Initiator-Caspase-8) auf ihre Aktivierung der Caspase-3 und deren proteolytischer Aktivität zurückzuführen war [31].

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung des intrinsischen Apoptosewegs während der CVB3-Infektion nachgewiesen werden, abweichend davon war jedoch eine frühe Prozessierung und initiale Beteiligung des extrinsischen Signalwegs ebenfalls erkennbar. Weiterhin führte bei Carthy et al. (2003) die Überexpression von Bcl-2 und Bcl-x_L oder die Zugabe von z-VAD-fmk und die damit verbundene fehlende Caspase-Aktivität nicht zu einem sichtbaren Einfluss auf den ZPE [31], was mit den hier vorliegenden Daten übereinstimmt. Der Einfluss von z-VAD-fmk bzw. Bcl-2/Bcl-x_L auf die Virusreplikation bei diesen Experimenten erscheint jedoch nicht ganz klar. Eine Analyse des Virustiters erfolgte 10 h p. i. In den nicht behandelten Kontrollen wurde zu diesem Zeitpunkt nur ~1% der Viren extrazellulär nachgewiesen, ein Hinweis darauf, dass der Replikationszyklus (inklusive Virusfreisetzung) noch nicht abgeschlossen war. Dies zeigen auch andere Daten der Arbeitsgruppe, in denen die extrazelluläre Viruskonzentration nach 10 h noch weiter anstieg [30]. Die Autoren geben an, dass sich bei der Zugabe von z-VAD-fmk der intrazelluläre Virustiter erhöhte (von $\sim 10^9$ auf $\sim 10^{10,5}$ pfu/ml), was einer gleichzeitigen Reduktion der extrazellulären Konzentration (von $\sim 10^7$ auf $\sim 10^{5,5}$ pfu/ml) entsprach und demnach nicht die Virusreplikation an sich, sondern lediglich die Freisetzung durch den Inhibitor beeinflusst wäre. Eine genauere Analyse ihrer Daten und die Beachtung ihrer Logarithmierung widerspricht dem jedoch. Die scheinbar entsprechende Zunahme bzw. Abnahme des Virustiters um jeweils 1,5 log-Stufen ist nicht vergleichbar, da die Konzentration von intra- und extrazellulären Viren sehr verschieden ist. Die intrazelluläre Zunahme an Viren (~30-fach) ist ausschlaggebend für den gesamten Virustiter, da nahezu alle Viren (99%) innerhalb der Zellen lokalisiert waren. Die reduzierte extrazelluläre Viruskonzentration ist demgegenüber vernachlässigbar, so dass aus der Zugabe von z-VAD-fmk insgesamt eine Erhöhung des Virustiters um das 30-fache gegenüber der Kontrolle resultierte. Die Feststellung der, verglichen mit der nicht inhibierten Kontrolle, reduzierten Virusfreisetzung bleibt davon unberührt. Es ist jedoch zu bedenken, inwieweit dieser Befund Aussagekraft besitzt, da der Anteil der freigesetzten Viren in der Kontrolle nur 1% betrug und die Bedeutung einer weiteren Reduktion eventuell gering einzuschätzen wäre. Sehr ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des Virustiters wurden bei der Überexpression von Bcl-2 bzw. Bcl-x_L erhalten. Aus diesem Grund können Überlegungen bezüglich der unspezifischen Wirkung von z-VAD-fmk vernachlässigt werden, denn dieser wurde wahrscheinlich in methylierter Form verwendet, da der angegebene Hersteller nur diese Variante anbietet.

Unter Berücksichtigung der 10 h p. i. deutlich erhöhten Viruskonzentrationen bei z-VAD-fmk-Zugabe bzw. Bcl-2- oder Bcl-x_L-Überexpression ist die in diesen Proben 18 h p. i. auffällig gesteigerte Zellvitalität im Vergleich zu Kontrollzellen (von ~1% vitalen Zellen auf ~40% bzw. ~60%) schwer zu erklären. Dies würde auf einen erheblichen Anteil der Caspase-Aktivitäten an der Zellvitalität hindeuten und das obwohl offenbar kein Einfluss ihrer Aktivität auf die Ausbildung des ZPE vorlag. Der Anteil wäre ausserdem von größerer Bedeutung als die

zytotoxische Wirkung der viralen Proteasen, obwohl deren Konzentration (durch die gesteigerte Virussyntese) in den behandelten Proben noch weiter erhöht war.

Diese teils unklar ausgewerteten Daten ermöglichen keinen schlüssigen Vergleich mit den hier vorliegenden Ergebnissen, bis auf den übereinstimmenden Befund der Bedeutung des mitochondrialen Apoptosewegs sowie der abweichenden Caspase-8-Prozessierung mit initialer (vorliegende Arbeit) bzw. sekundärer Funktion [31]. Die unterschiedliche Beteiligung dieser Caspase könnte auf die Verwendung verschiedener Zellen (HeLa bzw. GMK und Jurkat) zurückzuführen sein.

Eine weitere Veröffentlichung befasste sich ebenfalls mit dem Einfluss der Apoptose auf die Replikation von Picornaviren, untersuchte dies jedoch anhand des humanen Rhinovirus 14 (HRV14) in HeLa-Zellen [49]. In diesen Experimenten wurde der ZPE durch z-VAD-fmk (demethyliert durch Vorinkubation) gemildert. Auch die Zellvitalität war verglichen mit einer auf 20% reduzierten Vitalität in infizierten, nicht behandelten Kontrollzellen 12 h p. i. unbeeinträchtigt. Bei diesen Unterschieden zu den hier vorliegenden Daten sind jedoch die experimentellen Bedingungen zu berücksichtigen. HeLa-Zellen allein scheinen nicht für diesen erhöhten Anteil der Caspase-Aktivität am ZPE verantwortlich zu sein, da bei Carthy et al. (2003) der ZPE in HeLa-Zellen nach Infektion mit CVB3 nicht durch z-VAD-fmk beeinflusst wurde [31]. Demnach könnten einerseits abweichende Wirkungen der rhinoviralen Proteasen eine Rolle spielen. Andererseits ist ebenfalls die Applikation von z-VAD-fmk zu bedenken. Dieser wurde für eine intrazelluläre Demethylierung 1 h vor der Infektion zugegeben. Wie an den hier dargestellten Experimenten erkennbar war, ist es wahrscheinlich, dass diese Zeit auch in HeLa-Zellen nicht für eine vollständige Demethylierung ausreichte, zumal eine höhere z-VAD-fmk-Konzentration (200 μ M) verwendet wurde. Der 12 h p. i. sichtbare positive Effekt von z-VAD-fmk wäre auch in diesem Fall auf die anfänglich inhibierte Synthese viraler Proteasen zurückzuführen und kein Zeichen für eine Beteiligung von Caspasen am ZPE, so dass ebenfalls die erhöhte Zellvitalität zu erwarten wäre. Dass diese so deutlich ausfällt, könnte an den ungleichen Testbedingungen liegen, wodurch unterschiedliche zelluläre Funktionen analysiert wurden, deren Beeinflussung durch die viralen Proteasen zeitlich nicht identisch sein muss. Deszcz et al. (2005) verwendeten den MTT-Test, der auf der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen basiert, während in der vorliegenden Arbeit die Permeabilität der Zellmembran für den Farbstoff Trypanblau getestet wurde.

Die Beeinflussung der HRV14-Replikation durch z-VAD-fmk erfolgte 12 h p. i. durch die Bestimmung der intra- und extrazellulären Viruskonzentration. In unbehandelten Zellen lagen zu diesem Zeitpunkt 60% der Viren extrazellulär vor, die Zugabe von z-VAD-fmk reduzierte diesen Anteil auf <1%. Diese Reduktion der Freisetzung resultierte in einer entsprechend erhöhten intrazellulären Viruskonzentration. Bei diesen Experimenten beschränkte sich demnach die fehlende Caspase-Aktivität auf die Hemmung der Virusfreisetzung, die Virusreplikation selbst wurde nicht beeinträchtigt. Damit zeigt sich, dass auch im rhinoviralen

System die Induktion der Apoptose einen positiven Einfluss auf die Virusreplikation besitzt, wenn auch scheinbar nicht so ausgeprägt wie bei CVB3H3, sondern auf die Freisetzung der Viren beschränkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe nicht methylierter pan-Caspase-Inhibitoren gezeigt werden konnte, dass apoptotische Prozesse für die effiziente CVB3H3-Replikation *in vitro* von Bedeutung sind. Die Inhibierung der Caspase-Aktivitäten beeinträchtigte sowohl die Virusvermehrung selbst als auch die Freisetzung der neugebildeten Nachkommen-viren. An der Ausbildung des ZPE und der damit korrelierenden Zellvitalität waren Caspase-Aktivitäten dagegen nicht beteiligt, so dass diese Prozesse auf die Wirkung der viralen Proteasen zurückgeführt werden können.

5.1.6. Fazit: Enterovirale Infektionen und Apoptose

Gerade in jüngster Zeit haben die Kenntnisse über die Beteiligung apoptotischer Prozesse im Verlauf von Picornavirus-Infektionen bedeutend an Komplexität gewonnen. Durch die relativ kurzen Replikationszyklen und die umfassende Wirkung der viralen Proteasen, die zum Abschalten des Zellstoffwechsels und zu auffälligen morphologischen Veränderungen führen, sind apoptotische Zellveränderungen erst in den letzten Jahren in den Blickpunkt der Forschung geraten. Dies beschränkte sich anfangs auf den Nachweis des Auftretens dieses Signalwegs im Verlauf der viralen Pathogenese, wie dies beispielsweise für PV in CaCo-2-Zellen sowie für CVB3 in HeLa- oder U937-Zellen möglich war [6, 30, 113]. Diese Apoptose-induzierende Funktion der Enteroviren konnte auf die Funktion der viralen 2A- und 3C-Protease zurückgeführt werden [67, 14], so dass die Induktion der Apoptose bei enteroviralen Infektionen auch aktiv durch das Virus erfolgt und nicht (nur) das Ergebnis einer Abwehrfunktion der infizierten Zelle (z. B. über die PKR) darstellt. Bereits früh wurde jedoch deutlich, dass zu den Apoptose-modulierenden Faktoren der Enteroviren auch antiapoptotische Funktionen gehören. Dies zeigte sich bei PV-Infektionen in HeLa-Zellen, bei denen unter produktiven Bedingungen nur eine Ausprägung des ZPE erfolgte. Erst Beschränkungen, die die Virusreplikation inhibierten (Zugabe von GuHCl, Temperaturerhöhung bei ts-Mutanten), veranlassten die Ausführung des apoptotischen Programms [199]. In PV-replizierenden Zellen überwiegte demnach der antiapoptotische Faktor die Apoptose-induzierenden Funktionen der viralen Proteasen. Dieser antiapoptotische Zustand infizierter Zellen war außerdem in der Lage eine durch chemische Agenzien induzierte Apoptose zu verhindern.

Versuche in jüngster Zeit, die Natur des antiapoptotischen Faktors aufzuklären zeigten, dass es sich dabei wahrscheinlich nicht um einen einzigen Mechanismus handelt, sondern mehrere Faktoren dazu beitragen. So konnten Campanella et al. (2004) nachweisen, dass die Expression des 2B-Proteins von CVB3 die Chemikalien-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen inhibieren konnte [28]. Die antiapoptotische Wirkung von 2B resultierte aus der Beein-

flussung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase durch eine Porenbildung und damit verbundene Permeabilisierung der Membranen des ER und Golgi-Apparats. Durch die erniedrigten Ca^{2+} -Spiegel in den Organellen waren apoptotische Signale nicht mehr in der Lage, die Kommunikation zwischen ER und Mitochondrien (über die Ca^{2+} -Ionen) zu nutzen und dadurch die mitochondriale Membran zu permeabilisieren und Cyt C freizusetzen. Diese Funktion von 2B zeigt, dass ER-abhängige apoptotische Signalwege während der CVB3-Infektion ebenfalls von Bedeutung und an der Induktion des intrinsischen Apoptosewegs beteiligt sind. Auch eine inhibierende Wirkung auf den extrinsischen Apoptoseweg wurde bereits erkannt. So unterdrückte das 3A-Protein von PV den Rezeptor-vermittelten Weg, indem die Inhibierung des Proteintransports vom ER zum Golgi-Apparat zur Reduktion der TNF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche führte [132].

Einen weiteren Mechanismus zur Hemmung sowohl des extrinsischen als auch intrinsischen Apoptosewegs konnten Salako et al. (2006) aufdecken. Dort wurde nachgewiesen, dass das 2BC-Protein von CVB4 in der Lage ist, an die aktive Form der Caspase-3 zu binden und diese dadurch zu inhibieren, was der Funktion der IAP's ähnelt [165]. Dies ist auch ein Beispiel für die funktionelle Bedeutung der picornaviralen Vorläuferproteine, die sich von denen der reifen Proteine unterscheidet. Bei Versuchen, die antiapoptotische Aktivität von PV detaillierter zu bestimmen, deutet sich wiederum ein anderer Mechanismus an. Dort wurde festgestellt, dass es sowohl bei abortiven als auch bei produktiven Infektionen zur Freisetzung von Cyt C kommt, wobei bei letzteren jedoch auf noch ungeklärte Weise die anschließende korrekte Prozessierung der Caspase-9 verhindert wird [15].

Durch die Entdeckung der antiapoptotischen Faktoren der Enteroviren und der Konzentration auf die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen ist die Erforschung der Virus-vermittelten Apoptose-Induktion in den Hintergrund geraten. Die vorliegende Arbeit liefert dazu einen wichtigen Beitrag, indem sie am Beispiel von CVB3 aufzeigt, dass während einer produktiven enteroviralen Infektion nicht zwangsläufig antiapoptotische Funktionen ausgeprägt werden, sondern eine Induktion der Apoptose erfolgt, die eine unterstützende Wirkung auf die Virusreplikation per se sowie auf die Freisetzung der Nachkommenviren hat. Ebenso konnten die apoptotischen Signalwege näher beleuchtet und dargelegt werden, dass beide – sowohl intrinsischer als auch extrinsischer – Apoptosewege beteiligt sind. Die frühe Prozessierung der pro-Caspase-8 unterstützte die Initiation des mitochondrialen Apoptosewegs. Die weitere Aktivierung erfolgte Caspase-unabhängig, wobei eine Bedeutung des p53-Proteins angenommen wird, dessen Transkription während der CVB3-Infektion stark erhöht war. Die maximale Aktivität der Caspase-3 wurde gegen Ende des Replikationszyklus erreicht. Dieses zeitliche Zusammenfallen von apoptotischer Aktivität und beendeter Virusreplikation könnte für die Pathogenität von entscheidender Bedeutung sein, da dadurch die Virusfreisetzung nicht nur unterstützt wird, sondern innerhalb der apoptotischen, membranumhüllten Vesikel („apoptotic bodies“) stattfinden kann. Damit einhergehend ist einerseits ein Schutz vor dem

Immunsystem und andererseits eine effiziente Neuinfektion durch die Aufnahme in benachbarte Zellen möglich.

Eine neue Veröffentlichung verdeutlichte, dass die Bandbreite möglicher zellulärer Antworten auf enterovirale Infektionen nicht auf die Entscheidung zwischen ZPE und Apoptose beschränkt ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen muriner L20B-Zellen zeigten, dass die Infektion mit PV gleichzeitig zum Auftreten typischer Marker des ZPE und der Apoptose innerhalb einer Zellkultur und teils sogar innerhalb einer Zelle führte. Währenddessen wurden in humanen RD-Zellen keinerlei Anzeichen für die Induktion der Apoptose nach PV-Infektion gefunden, weder unter produktiven noch unter abortiven Bedingungen [157].

Damit hat sich das Bild der Beziehung von Enterovirus und Apoptose seit Beginn der vorliegenden Arbeit sehr verändert, zahlreiche Details konnten vervollständigt werden, auch wenn die hohe Variabilität der apoptotischen Prozesse noch viele Fragen aufweist. Wie mit den dargelegten Experimenten demonstriert, profitiert das Virus von einem apoptotischen Programm, das gegen Ende des Replikationszyklus aktiv wird. Daher könnte spekuliert werden, dass die antiapoptotischen Funktionen dazu dienen, wenn notwendig, die Induktion der Apoptose zeitlich für das Virus vorteilhaft zu modellieren und nicht vollständig zu inhibieren. Diese Funktion der Verzögerung der Apoptose wurde auch von van Kuppeveld et al. (2005) in Bezug auf die Funktion des 2B-Proteins von CVB3 vorgeschlagen [206]. Damit wäre die Zelle und deren Potential zur Apoptose-Induktion ausschlaggebend für die Variabilität der apoptotischen Antworten. So ist anzunehmen, dass die apoptotischen Mechanismen in verschiedenen Wirtszellen auch aufgrund einer unterschiedlichen apoptotischen Ausstattung differieren. Beispielsweise könnte die Fähigkeit zur Aktivierung des extrinsischen Signalwegs durch eine unterschiedliche Expression seiner Komponenten beeinflusst werden. Von diesen genetischen Unterschieden abgesehen sind auch variierende physiologische Bedingungen (humorale Faktoren wie Zytokine, Differenzierungsstadium, Nachbarzellen) verantwortlich für das Ausmaß der Apoptose einer Zelle [157].

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass Enteroviren durch die Multifunktionalität ihrer Proteine und damit trotz der begrenzten Kapazität ihres RNA-Genoms in der Lage sind, umfassend die Wirtszell-Antwort zu kontrollieren und modulieren. Es ist zu erwarten, dass in der nächsten Zeit dieses Bild der Virus-Wirtszell-Interaktion zusätzlich ergänzt wird – eine Voraussetzung für die weitere Aufklärung der Pathomechanismen der enteroviralen Infektionen.

5.2. Expression der Interaktionspartner VP2 und Siva

Die Bedeutung der mit Hilfe des Hefe-Zweihybrid-Systems gefundenen Wechselwirkung zwischen dem viralen Kapsidprotein VP2 und dem proapoptotischen Wirtszellprotein Siva sollte *in vitro* näher charakterisiert werden. Die Grundlage dafür bildeten Experimente im

Mausmodell, in denen die pathogenetischen Prozesse zwischen CVB3H3 und CVB3H310A1 verglichen wurden [74, 75]. Das VP2-Protein von CVB3H310A1 ist durch eine Aminosäuresubstitution nicht mehr in der Lage, effizient mit Siva zu interagieren. Beim Vergleich dieser Virusvariante mit CVB3H3 zeigte sich, dass die fehlende VP2-Siva-Interaktion mit einer geringeren Zerstörung des Pankreasgewebes, der Reduktion apoptotischer Zellen, einer fehlenden Induktion der *siva*-Transkription sowie einer beeinträchtigten Virusausbreitung im Organismus verbunden war. Da sich die induzierten Immunantworten der beiden Virusvarianten unterscheiden [97], sollte *in vitro* untersucht werden, welchen Anteil die Siva-induzierte Apoptose an der unterschiedlichen Pathogenität der Viren hat.

Zu Beginn wurde die Siva-mRNA-Expression in nicht infizierten und CVB3H3- bzw. CVB3H310A1-infizierten 293-Zellen untersucht (Abb. 5). Dabei war festzustellen, dass in allen Proben die Siva-spezifische mRNA detektierbar war, wobei in der frühen Phase der Infektion mit CVB3H3 eine gesteigerte Synthese zu erkennen war, die im weiteren Verlauf jedoch wieder auf das Niveau nicht infizierter Zellen sank. CVB3H310A1-infizierte Zellen zeigten dagegen keine erhöhte Transkription von *siva*. Eine Expression von Siva auf Proteinebene war mit Hilfe des Western Blots jedoch nicht erkennbar. Auch die Untersuchung anderer Zelllinien mit nachweisbarer mRNA-Expression erbrachte keine positiven Resultate. Lediglich in humanen T-Lymphozyten (Jurkat-Zellen) konnten spezifische Signale detektiert werden, deren Molekulargewichte Siva-1 und der verkürzten Spleißvariante Siva-2 entsprachen. Die Intensität der Signale wurde durch die Infektion mit CVB3H3 (8 h p. i.) nicht beeinflusst (Abb. 6). Vergleiche mit der Literatur zeigen, dass nahezu alle Studien zu Siva mit rekombinant exprimierten Fusionsproteinen (mit GST-tag, HA-tag oder fusioniert an EGFP) durchgeführt wurden. Der Nachweis der Siva-Expression in verschiedenen Zelllinien und Organen erfolgte ebenfalls nur auf RNA-Ebene [146, 232]. Lediglich bei 4 Zelllinien wurde die endogene Siva-Expression nachgewiesen, wobei es sich dabei entweder um T- oder B-Lymphozyten handelte. Diese Beobachtung stimmt mit den Befunden der vorliegenden Arbeit überein. Es ist anzunehmen, dass diese translationale Kontrolle im Zusammenhang mit der proapoptischen Funktion des Proteins steht.

Aus diesem Grund wurde ein induzierbares Expressionssystem zur rekombinanten Synthese sowohl von Siva als auch der VP2-Kapsidproteine von CVB3H3 und CVB3H310A1 verwendet. Das Tet-On System mit dem pBI-Vektor erlaubt nach Doxyzyklin-Zugabe die simultane Expression zweier rekombinanter Proteine, wobei das EGFP zur Kontrolle der Transfektionseffizienz in die MCS I des Vektor inseriert wurde. Die Expressionsanalyse der Konstrukte zeigte, dass die Synthese des EGFP durch die Insertion von Siva oder VP2 bzw. VP2H310A1 in die MCS II zwar abnahm aber nachweisbar blieb, jedoch keine Expression der MCS II-Inserts detektiert werden konnte. Auch die reverse Insertion der kodierenden Sequenzen (in die MCS I) führte nicht zur Synthese der entsprechenden Proteine, auch die EGFP-Expression (von der MCS II aus) war nicht mehr detektierbar (Abb. 8). Da sich durch

die Insertion der Siva- bzw. VP2-Sequenzen (trotz ihrer fehlenden Expression), auch die Synthese des EGFP deutlich verringerte (Abb. 9), erwies sich der bidirektionale Ansatz als ungeeignet für eine effiziente Expression. Bei dem Versuch, nur ein Protein ausgehend von der MCS I des Vektors zu exprimieren, zeigte sich, dass lediglich verkürzte VP2-spezifische Fragmente sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene gebildet wurden, obwohl der Nachweis der kompletten VP2-Sequenz auf DNA-Ebene möglich war (Abb. 10). Dieses Ergebnis bestätigte sich bei Verwendung eines weiteren Expressionsvektors mit konstitutivem Promoter. Auch hier traten sowohl verkürzte RNA- als auch Proteinfragmente des VP2-Proteins auf (Abb. 12). Der Versuch die VP2-Proteine ausgehend von *in vitro*-transkribierter RNA zu synthetisieren, führte ebenfalls nicht zum Erfolg im Gegensatz zum EGFP, das als methodische Kontrolle verwendet und fluoreszenzmikroskopisch detektiert wurde. Bei den Versuchen Siva rekombinant zu exprimieren, zeigte sich, dass die Transfektion von pBI-Siva nicht zu einer gesteigerten mRNA-Synthese führte (Abb. 10B), während nach Transfektion von *in vitro*-transkribierter RNA zwar ein Anstieg der Siva-spezifischen RNA sichtbar war (Abb. 13), was jedoch nicht zu einer nachweisbaren Synthese des Proteins führte.

Trotz verschiedener Strategien war es nicht möglich Siva oder VP2 bzw. VP2H310A1 zu exprimieren, was ein Hinweis auf nachteilige Effekte der Proteine in der Zellkultur ist. Um mögliche Auswirkungen einer VP2-Siva-Interaktion trotzdem analysieren zu können, wurden in Anlehnung an die Literatur ebenfalls Fusionskonstrukte mit EGFP hergestellt. Bei der transienten Transfektion von EGFP, EGFP/Siva, EGFP/VP2 bzw. EGFP/VP2H310A1 war in allen Fällen die grüne Fluoreszenz des EGFP sichtbar. Während die viralen Proteine keinen erkennbaren Einfluss auf die Morphologie der Zellen besaßen, führte die Expression von EGFP/Siva zu deutlichen Veränderungen der Zellen, die sich zusammenzogen, abrundeten und zerfielen (Abb. 15). Dies wurde auch bei Prasad et al. (1997) beschrieben [146]. Im Gegensatz dazu konnte jedoch eine dort beobachtete Fragmentierung chromosomaler DNA auf herkömmliche Art nicht nachgewiesen werden. Erst die Verwendung eines sensitiven Tests, der eine Amplifikation von DNA-Fragmenten erlaubt, führte zur Detektion des Siva-induzierten „DNA-Laddering“ (Abb. 16, 17). Die ursächliche Beteiligung von Caspasen an diesem Prozess konnte durch die Zugabe von z-VAD-fmk gezeigt werden, wodurch die DNA-Fragmentierung nahezu vollständig gehemmt wurde (Abb. 18). Die Ursache für diese unterschiedliche Sensitivität der Zellen für die Siva-vermittelte Apoptose-Induktion ist unklar. Yoon et al. (1999) beschreiben jedoch, dass Siva in manchen Zelllinien trotz hoher Expressionslevel (von EGFP/Siva) die Aktivierung des apoptotischen Programms nicht induzierte [232]. Diese Unterschiede könnten auf der unterschiedlichen Expression von Komponenten der Siva-induzierten Signalwege beruhen oder auf effizienten Siva-neutralisierenden anti-apoptotischen Mechanismen. Da jedoch sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der von Prasad et al. (1997) die Expression in 293-Zellen stattfand, waren diese Unterschiede nicht zu erwarten. Bei der transienten Expression von EGFP/VP2 sowie von

EGFP/VP2H310A1 konnte kein signifikanter Einfluss auf die Fragmentierung der DNA beobachtet werden. Da bei transienten Transfektionen die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschwert ist, wurden 293-Zellen stabil transfiziert.

Nach der Etablierung der Zelllinien wurde die Synthese der Fusionsproteine sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene überprüft (Abb. 19). Dabei zeigte sich einerseits, dass die Fusionsproteine mit den erwarteten Molekulargewichten korrekt exprimiert wurden. Daneben waren jedoch auch Abbauprodukte der Fusionsproteine zu sehen, die zu den einzelnen Fusionspartnern (EGFP, Siva) oder auch weiteren Zwischenprodukten (EGFP/VP2, EGFP/VP2H310A1) führten. Andererseits wurde deutlich, dass die Expression von EGFP/VP2 nicht in der Lage war, eine gesteigerte *siva*-Transkription zu induzieren. Diese bei der CVB3H3-Infektion zu beobachtende Hochregulierung ist daher wahrscheinlich nicht auf das VP2-Protein und dessen Interaktion mit Siva zurückzuführen. Es bliebe zu spekulieren, inwieweit p53 für die erhöhte *siva*-Transkription verantwortlich ist, da einerseits die Regulation von *siva* durch diesen Transkriptionsaktivator nachgewiesen wurde [44, 62] und andererseits wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die *p53*-Transkription durch die Infektion mit CVB3 gesteigert wird.

Die mikroskopische Analyse der stabilen Zelllinien zeigte nur bei EGFP/Siva-293-Zellen Unterschiede im Vergleich zu EGFP-293-Zellen. Diese glichen jedoch nicht mehr den ausgeprägten zytopathogenen Veränderungen der transienten Transfektion. Die Zellen waren vital, die EGFP-Expression konnte jedoch im Gegensatz zu den anderen Fusionsproteinen und zur transienten Transfektion nur noch im Zellkern detektiert werden (Abb. 20-22). Dabei ist kein Rückschluss darauf möglich, inwieweit die unterschiedliche Lokalisierung des Proteins mit seiner proapoptotischen Funktion verbunden ist. Sowohl die intranukleäre [147] als auch eine mitochondrial-assoziierte [222] Lokalisierung wurde bei Überexpression von Siva-Fusionsproteinen beschrieben, was in beiden Fällen apoptotische Prozesse induzierte. Das verbesserte morphologische Erscheinungsbild zeigte sich auch in einer fehlenden DNA-Fragmentierung in den stabil-transfizierten EGFP/Siva-Zellen (Abb. 23A) und einer im Vergleich zu Kontrollzellen unbeeinträchtigten Teilungsrate der Zelllinie (Abb. 24). Die Untersuchung der DNA-Fragmentierung in EGFP/VP2- bzw. EGFPVP2H310A1-Zellen ließ kurzfristig in frisch etablierten Kulturen eine erhöhte Apoptoserate bei Expression des VP2-Proteins, verglichen mit Kontrollzellen und VP2H310A1-Expression, erkennen (Abb. 23B). Diese war jedoch nicht mehr in mehrfach passagierten Kulturen nachweisbar. Durch diese offensichtliche Adaption der transfizierten Kulturen, die zur Unterdrückung der Apoptose-Induktion führte, war eine weitere Charakterisierung der Zellen nicht möglich. Daher wurde noch einmal im transienten Expressionssystem anhand der DNA-Fragmentierung untersucht, ob bei einer Doppeltransfektion von Zellen mit Siva- und VP2-kodierenden Plasmiden eine gesteigerte Apoptoserate sichtbar war, was jedoch nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 26).

Die Unmöglichkeit der Etablierung einer stabilen, induzierbaren Expression von VP2 oder Siva sowie die Adaption stabil, konstitutiv exprimierender Zellen ließen keine eingehende Analyse der Interaktion dieser beiden Bindungspartner in der Zellkultur zu. Im transienten System, das naturgemäß größeren Schwankungen unterliegt, war kein Effekt einer alleinigen VP2-Expression zu erkennen. Durch die erheblichen morphologischen Auswirkungen der transienten Expression von Siva allein war jedoch die Detektion zusätzlicher Wirkungen durch die Doppeltransfektion mit VP2 nicht zu erwarten.

Auch wenn die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der apoptotischen Prozesse während der CVB3-Infektion leisten konnte, war es nicht möglich, die Bedeutung der VP2-Siva-Interaktion zu präzisieren. Abgesehen vom zeitlich geringfügig verzögerten Auftreten apoptotischer Prozesse war die CVB3H310A1-Variante *in vitro* ebenfalls zu einer effizienten Apoptose-Induktion fähig. Zu prüfen wäre dabei, ob die beobachteten Unterschiede zwischen CVB3H3 und CVB3H310A1 im Mausmodell nicht auch eher auf eine verzögerte als auf eine generell beeinträchtigte Induktion der Apoptose hinweisen. Inwieweit die unterschiedliche Transkriptionsaktivierung von *siva* (Abb. 5) eine Ursache für die zeitliche Verzögerung darstellt, ist fraglich, da die Translation von Siva nicht nachweisbar war. Dies würde auch, zumindest *in vitro*, eher für eine modulierende als für eine essentielle Funktion des Siva-Proteins während der CVB3-induzierten Apoptose sprechen. Trotz der ubiquitären Expression der mRNA war das Siva-Protein nur in T-Lymphozyten detektierbar. Da sich diese jedoch bei Infektion mit CVB3H3, zumindest hinsichtlich der Prozessierung der Caspasen, nicht von GMK-Zellen (ohne Siva-Translation) unterscheiden, kann daraus keine Wirkung des Proteins abgeleitet werden. Dies müsste gegebenenfalls eingehender untersucht werden. Bisher publizierte Daten [68, 89, 147, 222, 232] weisen darauf hin, dass der Nachweis des endogenen Siva-Proteins auf Zellen des Immunsystems beschränkt ist, was auf eine spezielle Funktion von Siva in diesen Zellen mit hoher Apoptoserate hinweisen könnte. Damit hätten die scheinbar unabhängigen Eigenschaften der Virusvarianten CVB3H3 und CVB3H310A1 – die unterschiedliche Fähigkeit der VP2-Proteine zur Siva-Interaktion und die Induktion verschiedener Immunantworten – vielleicht eine gemeinsame Grundlage und könnten vielmehr zusammen als getrennt voneinander untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit war es, den Prozess einer CVB3-induzierten Apoptose als einen Pathomechanismus der viralen Infektion *in vitro* zu analysieren. Dabei sollte zum einen die Aufklärung der beteiligten apoptotischen Signalwege erfolgen und überprüft werden, inwieweit die unterschiedliche Pathogenität der Virusvarianten CVB3H3 und CVB3H310A1 *in vivo* in Zusammenhang mit einer abweichenden Induktion der Apoptose *in vitro* steht. Zum anderen wurde untersucht, welche Bedeutung die Apoptose für die Replikation der Viren besitzt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *in vitro* sowohl in CVB3H3- als auch in CVB3H310A1-infizierten Zellen typische apoptotische Veränderungen der Zellkerne nachgewiesen werden konnten. Die den beobachteten Prozessen zugrunde liegende Caspase-3-Aktivität war bei beiden Virusvarianten detektierbar und erreichte ihre maximale Wirksamkeit am Ende des Replikationszyklus. Die Beteiligung beider apoptotischer Signalwege – des extrinsischen und des intrinsischen – an der Aktivierung der Caspase-3 konnte einerseits durch die frühzeitige Prozessierung der entsprechenden Initiator-Caspasen (Caspase-8 bzw. -9) belegt werden. Andererseits wurde die Induktion beider Apoptosewege während der CVB3H3-Infektion anhand der, für die Caspase-9-Aktivierung unerlässlichen, Cyt C-Freisetzung aus den Mitochondrien sowie einer gesteigerten Transkription zahlreicher Komponenten des extrazellulären Apoptosewegs nachgewiesen. Die deutlich erhöhte Transkription von *p53* lässt eine zentrale Rolle dieses Genprodukts sowohl bei der transkriptionsabhängigen als auch -unabhängigen Regulation der CVB3H3-induzierten Apoptose vermuten. Der Vergleich von CVB3H3 und CVB3H310A1 hinsichtlich apoptotischer Zellveränderungen, Caspase-3-Aktivierung und Cyt C-Freisetzung erbrachte keinen Hinweis auf abweichende Mechanismen dieser Virusvarianten bei der Aktivierung apoptotischer Prozesse *in vitro*. Die Ursache für die Zeitverzögerung der Vorgänge bei CVB3H310A1 kann nicht in der unterschiedlichen Wechselwirkung der VP2-Kapsidproteine von CVB3H3 bzw. CVB3H310A1 mit dem proapoptotischen Protein Siva gesehen werden, da eine Beteiligung von Siva an der Induktion der Apoptose während der Virusinfektion im verwendeten experimentellen System nicht ersichtlich war. Die Untersuchung der Bedeutung apoptotischer Prozesse für die Virusreplikation *in vitro* erfolgte durch die Anwendung von pan-Caspase-Inhibitoren. Dabei zeigte sich, dass die beobachtete reduzierte Zytopathogenität und verzögerte Cyt C-Freisetzung in virusinfizierten Zellen bei Zugabe von z-VAD-fmk nicht auf eine Hemmung der Apoptose, sondern auf die Inhibierung der Virusreplikation zurückzuführen war, die aus der Inaktivierung der 2A- und 3C-Protease durch z-VAD-fmk resultierte. Die Erkenntnis, dass die viralen Proteasen durch kleine methylierte Peptide hemmbar sind, bietet einen möglichen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapeutika und könnte damit eine weitreichendere Bedeutung für klinische Fragestellungen erlangen. Mit Hilfe nicht methylierter pan-Caspase-Inhibitoren konnte nachgewiesen werden, dass apoptotische Prozesse für eine effiziente CVB3H3-Replikation *in vitro* von Bedeutung sind.

Die Inhibierung der Caspase-Aktivitäten beeinträchtigte sowohl die Virusvermehrung selbst als auch die Freisetzung der neugebildeten Nachkommenviren. Durch diesen begünstigenden Einfluss der Apoptose auf die virale Replikation könnte der Anwendung von pan-Caspase-Inhibitoren therapeutisches Potential zukommen, wohingegen ihre Verwendung im murinen Modell die Möglichkeit zu einem besseren Verständnis des CVB3-bedingten Krankheitsverlaufs bietet. Auf die Ausbildung des virusverursachten zytopathischen Effekts und die damit korrelierende Vitalität der infizierten Zellen hatten Caspase-Aktivitäten jedoch keinen Einfluss, so dass diese Prozesse auf die Wirkung der viralen Proteasen zurückgeführt werden können.

1. **ADAMS, J.M.** 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**:2481-2495.
2. **ADAMS, J.M., and CORY, S.** 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**:1322-1326.
3. **AGOL, V.I., BELOV, G.A., BIENZ, K., EGGER, D., KOLESNIKOVA, M.S., RAIKHLIN, N.T., ROMANOVA, L.I., SMIRNOVA, E.A., and TOLSKAYA, E.A.** 1998. Two types of death of poliovirus-infected cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology* **252**:343-353.
4. **AGOL, V.I., BELOV, G.A., BIENZ, K., EGGER, D., KOLESNIKOVA, M.S., ROMANOVA, L.I., SLADKOVA, L.V., and TOLSKAYA, E.A.** 2000. Competing death programs in poliovirus-infected cells: commitment switch in the middle of the infectious cycle. *J Virol* **74**:5534-5541.
5. **AHMAD, M., SRINIVASULA, S.M., WANG, L., TALANIAN, R.V., LITWACK, G., FERNANDES-ALNEMRI, T., and ALNEMRI, E.S.** 1997. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* **57**:615-619.
6. **AMMENDOLIA, M.G., TINARI, A., CALCABRINI, A., and SUPERTI, F.** 1999. Poliovirus infection induces apoptosis in CaCo-2 cell. *J Med Virol* **59**:122-129.
7. **ANNIS, M.G., ZAMZAMI, N., ZHU, W., PENN, L.Z., KROEMER, G., LEBER, B., and ANDREWS, D.W.** 2001. Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event. *Oncogene* **20**:1939-1952.
8. **ARCHARD, L.C., KHAN, M.A., SOTERIOU, B.A., ZHANG, H., WHY, H.J., ROBINSON, N.M., and RICHARDSON, P.J.** 1998. Characterization of Coxsackie B virus RNA in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy by nucleotide sequencing of reverse transcription-nested polymerase chain reaction products. *Hum Pathol* **29**:578-584.
9. **ASHKENAZI, A., and DIXIT, V.M.** 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**:1305-1308.
10. **BADORFF, C., LEE, G.H., LAMPHEAR, B.J., MARTONE, M.E., CAMPBELL, K.P., RHOADS, R.E., and KNOWLTON, K.U.** 1999. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med* **5**:320-326.
11. **BAE, J., LEO, C.P., HSU, S.Y., and HSUEH, A.J.** 2000. MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem* **275**:25255-25261.
12. **BANERJEE, R., ECHEVERRI, A., and DASGUPTA, A.** 1997. Poliovirus-encoded 2C polypeptide specifically binds to the 3'-terminal sequences of viral negative-strand RNA. *J Virol* **71**:9570-9578.
13. **BANERJEE, R., TSAI, W., KIM, W., and DASGUPTA, A.** 2001. Interaction of poliovirus-encoded 2C/2BC polypeptides with the 3' terminus negative-strand cloverleaf requires an intact stem-loop b. *Virology* **280**:41-51.
14. **BARCO, A., FEDUCHI, E., and CARRASCO, L.** 2000. Poliovirus protease 3C(pro) kills cells by apoptosis. *Virology* **266**:352-360.
15. **BELOV, G.A., ROMANOVA, L.I., TOLSKAYA, E.A., KOLESNIKOVA, M.S., LAZEBNIK, Y.A., and AGOL, V.I.** 2003. The major apoptotic pathway activated and suppressed by poliovirus. *J Virol* **77**:45-56.
16. **BENNETT, M., MACDONALD, K., CHAN, S.W., LUZIO, J.P., SIMARI, R., and WEISSBERG, P.** 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* **282**:290-293.
17. **BERGELSON, J.M., CUNNINGHAM, J.A., DROGUETT, G., KURT-JONES, E.A., KRITHIVAS, A., HONG, J.S., HORWITZ, M.S., CROWELL, R.L., and FINBERG, R.W.** 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**:1320-1323.
18. **BERGELSON, J.M., MOHANTY, J.G., CROWELL, R.L., ST JOHN, N.F., LUBLIN, D.M., and FINBERG, R.W.** 1995. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol* **69**:1903-1906.

19. **BERRIDGE, M.J., LIPP, P., and BOOTMAN, M.D.** 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**:11-21.
20. **BINGLE, C.D., CRAIG, R.W., SWALES, B.M., SINGLETON, V., ZHOU, P., and WHYTE, M.K.** 2000. Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem* **275**:22136-22146.
21. **BOATRIGHT, K.M., RENATUS, M., SCOTT, F.L., SPERANDIO, S., SHIN, H., PEDERSEN, I.M., RICCI, J.E., EDRIS, W.A., SUTHERLIN, D.P., GREEN, D.R., and SALVESEN, G.S.** 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **11**:529-541.
22. **BOWLES, N.E., RICHARDSON, P.J., OLSEN, E.G., and ARCHARD, L.C.** 1986. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* **1**:1120-1123.
23. **BROCKSTEDT, E., RICKERS, A., KOSTKA, S., LAUBERSHEIMER, A., DORKEN, B., WITTMANN-LIEBOLD, B., BOMMERT, K., and OTTO, A.** 1998. Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J Biol Chem* **273**:28057-28064.
24. **BROWN, D.G., SUN, X.M., and COHEN, G.M.** 1993. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J Biol Chem* **268**:3037-3039.
25. **BUDD, R.C., YEH, W.C., and TSCHOPP, J.** 2006. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol* **6**:196-204.
26. **BUENZ, E.J., and HOWE, C.L.** 2006. Picornaviruses and cell death. *Trends Microbiol* **14**:28-36.
27. **CALANDRIA, C., IRURZUN, A., BARCO, A., and CARRASCO, L.** 2004. Individual expression of poliovirus 2Apro and 3Cpro induces activation of caspase-3 and PARP cleavage in HeLa cells. *Virus Res* **104**:39-49.
28. **CAMPANELLA, M., DE JONG, A.S., LANKE, K.W., MELCHERS, W.J., WILLEMS, P.H., PINTON, P., RIZZUTO, R., and VAN KUPPEVELD, F.J.** 2004. The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by manipulating intracellular Ca²⁺ homeostasis. *J Biol Chem* **279**:18440-18450.
29. **CAO, C., REN, X., KHARBANDA, S., KOLESKE, A., PRASAD, K.V., and KUFÉ, D.** 2001. The ARG tyrosine kinase interacts with Siva-1 in the apoptotic response to oxidative stress. *J Biol Chem* **276**:11465-11468.
30. **CARTHY, C.M., GRANVILLE, D.J., WATSON, K.A., ANDERSON, D.R., WILSON, J.E., YANG, D., HUNT, D.W., and MCMANUS, B.M.** 1998. Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. *J Virol* **72**:7669-7675.
31. **CARTHY, C.M., YANAGAWA, B., LUO, H., GRANVILLE, D.J., YANG, D., CHEUNG, P., CHEUNG, C., ESFANDIAREI, M., RUDIN, C.M., THOMPSON, C.B., HUNT, D.W., and MCMANUS, B.M.** 2003. Bcl-2 and Bcl-xL overexpression inhibits cytochrome c release, activation of multiple caspases, and virus release following coxsackievirus B3 infection. *Virology* **313**:147-157.
32. **CARTHY, C.M., YANG, D., ANDERSON, D.R., WILSON, J.E., and MCMANUS, B.M.** 1997. Myocarditis as systemic disease: new perspectives on pathogenesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**:997-1003.
33. **CHAI, J., DU, C., WU, J.W., KYIN, S., WANG, X., and SHI, Y.** 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**:855-862.
34. **CHAI, J., SHIOZAKI, E., SRINIVASULA, S.M., WU, Q., DATTA, P., ALNEMRI, E.S., and SHI, Y.** 2001. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* **104**:769-780.
35. **CHANG, D.W., XING, Z., PAN, Y., ALGECIRAS-SCHIMNICH, A., BARNHART, B.C., YAISH-OHAD, S., PETER, M.E., and YANG, X.** 2002. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* **21**:3704-3714.
36. **CHU, F., BORTHAKUR, A., SUN, X., BARKINGE, J., GUDI, R., HAWKINS, S., and PRASAD, K.V.** 2004. The Siva-1 putative amphipathic helical region (SAH) is sufficient to bind to BCL-XL and sensitize cells to UV radiation induced apoptosis. *Apoptosis* **9**:83-95.

37. **CLARK, M.E., HAMMERLE, T., WIMMER, E., and DASGUPTA, A.** 1991. Poliovirus proteinase 3C converts an active form of transcription factor IIIC to an inactive form: a mechanism for inhibition of host cell polymerase III transcription by poliovirus. *Embo J* **10**:2941-2947.
38. **CLARK, M.E., LIEBERMAN, P.M., BERK, A.J., and DASGUPTA, A.** 1993. Direct cleavage of human TATA-binding protein by poliovirus protease 3C in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* **13**:1232-1237.
39. **COLLINS, J.A., SCHANDI, C.A., YOUNG, K.K., VESELY, J., and WILLINGHAM, M.C.** 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* **45**:923-934.
40. **COLSTON, J.T., CHANDRASEKAR, B., and FREEMAN, G.L.** 1998. Expression of apoptosis-related proteins in experimental coxsackievirus myocarditis. *Cardiovasc Res* **38**:158-168.
41. **COUDERC, T., GUIVEL-BENHASSINE, F., CALAORA, V., GOSSELIN, A.S., and BLONDEL, B.** 2002. An ex vivo murine model to study poliovirus-induced apoptosis in nerve cells. *J Gen Virol* **83**:1925-1930.
42. **CUDDIHY, A.R., LI, S., TAM, N.W., WONG, A.H., TAYA, Y., ABRAHAM, N., BELL, J.C., and KOROMILAS, A.E.** 1999. Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* **19**:2475-2484.
43. **DALLDORF G., and SICKLES, M.G.** 1948. An Unidentified, Filtrable Agent Isolated From the Feces of Children With Paralysis. *Science* **108**:61-62.
44. **DAOUD, S.S., MUNSON, P.J., REINHOLD, W., YOUNG, L., PRABHU, V.V., YU, Q., LAROSE, J., KOHN, K.W., WEINSTEIN, J.N., and POMMIER, Y.** 2003. Impact of p53 knockout and topotecan treatment on gene expression profiles in human colon carcinoma cells: a pharmacogenomic study. *Cancer Res* **63**:2782-2793.
45. **DATTA, S.R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y., and GREENBERG, M.E.** 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**:231-241.
46. **DE MARIA, R., LENTI, L., MALISAN, F., D'AGOSTINO, F., TOMASSINI, B., ZEUNER, A., RIPPO, M.R., and TESTI, R.** 1997. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* **277**:1652-1655.
47. **DER, S.D., ZHOU, A., WILLIAMS, B.R., and SILVERMAN, R.H.** 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15623-15628.
48. **DESZCZ, L., SEIPELT, J., VASSILIEVA, E., ROETZER, A., and KUECHLER, E.** 2004. Anti-viral activity of caspase inhibitors: effect on picornaviral 2A proteinase. *FEBS Lett* **560**:51-55.
49. **DESZCZ, L., GAUDERNAK, E., KUECHLER, E., and SEIPELT, J.** 2005. Apoptotic events induced by human rhinovirus infection. *J Gen Virol* **86**:1379-1389.
50. **DEVERAUX, Q.L., TAKAHASHI, R., SALVESEN, G.S., and REED, J.C.** 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**:300-304.
51. **DING, H.F., LIN, Y.L., MCGILL, G., JUO, P., ZHU, H., BLENIS, J., YUAN, J., and FISHER, D.E.** 2000. Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J Biol Chem* **275**:38905-38911.
52. **DODD, D.A., GIDDINGS, T.H., JR., and KIRKEGAARD, K.** 2001. Poliovirus 3A protein limits interleukin-6 (IL-6), IL-8, and beta interferon secretion during viral infection. *J Virol* **75**:8158-8165.
53. **DODSON, G.E., SHI, Y., and TIBBETTS, R.S.** 2004. DNA replication defects, spontaneous DNA damage, and ATM-dependent checkpoint activation in replication protein A-deficient cells. *J Biol Chem* **279**:34010-34014.
54. **DOEDENS, J., MAYNELL, L.A., KLYMKOWSKY, M.W., and KIRKEGAARD, K.** 1994. Secretory pathway function, but not cytoskeletal integrity, is required in poliovirus infection. *Arch Virol Suppl* **9**:159-172.
55. **DOHRMAN, A., KATAOKA, T., CUENIN, S., RUSSELL, J.Q., TSCHOPP, J., and BUDD, R.C.** 2005. Cellular FLIP (long form) regulates CD8+ T cell activation through caspase-8-dependent NF-kappa B activation. *J Immunol* **174**:5270-5278.

56. **DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L., and WANG, X.** 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**:33-42.
57. **DUAN, H., and DIXIT, V.M.** 1997. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* **385**:86-89.
58. **ELGIN, S.C.** 1990. Chromatin structure and gene activity. *Curr Opin Cell Biol* **2**:437-445.
59. **ENARI, M., SAKAHIRA, H., YOKOYAMA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A., and NAGATA, S.** 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**:43-50.
60. **ETCHISON, D., MILBURN, S.C., EDERY, I., SONENBERG, N., and HERSHEY, J.W.** 1982. Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J Biol Chem* **257**:14806-14810.
61. **FERRI, K.F., and KROEMER, G.** 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **3**:E255-263.
62. **FORTIN, A., MACLAURIN, J.G., ARBOUR, N., CREGAN, S.P., KUSHWAHA, N., CALLAGHAN, S.M., PARK, D.S., ALBERT, P.R., and SLACK, R.S.** 2004. The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *J Biol Chem* **279**:28706-28714.
63. **GAO, Z., SHAO, Y., and JIANG, X.** 2005. Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2-induced apoptosis. *J Biol Chem* **280**:38271-38275.
64. **GIL, J., and ESTEBAN, M.** 2000. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* **5**:107-114.
65. **GODENY, E.K., and GAUNTT, C.J.** 1987. In situ immune autoradiographic identification of cells in heart tissues of mice with coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Am J Pathol* **129**:267-276.
66. **GODENY, E.K., and GAUNTT, C.J.** 1987. Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol* **139**:913-918.
67. **GOLDSTAUB, D., GRADI, A., BERCOVITCH, Z., GROSMANN, Z., NOPHAR, Y., LURIA, S., SONENBERG, N., and KAHANA, C.** 2000. Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* **20**:1271-1277.
68. **GUDI, R., BARKINGE, J., HAWKINS, S., CHU, F., MANICASSAMY, S., SUN, Z., DUKE-COHAN, J.S., and PRASAD, K.V.** 2006. Siva-1 negatively regulates NF-kappaB activity: effect on T-cell receptor-mediated activation-induced cell death (AICD). *Oncogene* **25**:3458-3462.
69. **HACKI, J., EGGER, L., MONNEY, L., CONUS, S., ROSSE, T., FELLAY, I., and BORNER, C.** 2000. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* **19**:2286-2295.
70. **HARADA, H., BECKNELL, B., WILM, M., MANN, M., HUANG, L.J., TAYLOR, S.S., SCOTT, J.D., and KORSMEYER, S.J.** 1999. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* **3**:413-422.
71. **HAY, S., and KANNOURAKIS, G.** 2002. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* **83**:1547-1564.
72. **HEGDE, R., SRINIVASULA, S.M., ZHANG, Z., WASSELL, R., MUKATTASH, R., CILENTI, L., DUBOIS, G., LAZEBNIK, Y., ZERVOS, A.S., FERNANDES-ALNEMRI, T., and ALNEMRI, E.S.** 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* **277**:432-438.
73. **HENKE, A., HUBER, S., STELZNER, A., and WHITTON, J.L.** 1995. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol* **69**:6720-6728.
74. **HENKE, A., LAUNHARDT, H., KLEMENT, K., STELZNER, A., ZELL, R., and MUNDER, T.** 2000. Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J Virol* **74**:4284-4290.

75. **HENKE, A., NESTLER, M., STRUNZE, S., SALUZ, H.P., HORTSCHANSKY, P., MENZEL, B., MARTIN, U., ZELL, R., STELZNER, A., and MUNDER, T.** 2001. The apoptotic capability of coxsackievirus B3 is influenced by the efficient interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic host protein Siva. *Virology* **289**:15-22.
76. **HENKE, A., WAGNER, E., WHITTON, J.L., ZELL, R., and STELZNER, A.** 1998. Protection of mice against lethal coxsackievirus B3 infection by using DNA immunization. *J Virol* **72**:8327-8331.
77. **HENKE, A., ZELL, R., EHRLICH, G., and STELZNER, A.** 2001. Expression of immunoregulatory cytokines by recombinant coxsackievirus B3 variants confers protection against virus-caused myocarditis. *J Virol* **75**:8187-8194.
78. **HOFFMANN, R., and VALENCIA, A.** 2004. A gene network for navigating the literature. *Nat Genet* **36**:664.
79. **HSU, Y.T., and YOULE, R.J.** 1998. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* **273**:10777-10783.
80. **HU, H.M., O'ROURKE, K., BOGUSKI, M.S., and DIXIT, V.M.** 1994. A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J Biol Chem* **269**:30069-30072.
81. **HUANG, Y., PARK, Y.C., RICH, R.L., SEGAL, D., MYSZKA, D.G., and WU, H.** 2001. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* **104**:781-790.
82. **HUBER, S.A., and PFAEFFLE, B.** 1994. Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J Virol* **68**:5126-5132.
83. **HUBER, S.A., POLGAR, J., SCHULTHEISS, P., and SCHWIMMBECK, P.** 1994. Augmentation of pathogenesis of coxsackievirus B3 infections in mice by exogenous administration of interleukin-1 and interleukin-2. *J Virol* **68**:195-206.
84. **IWAWAKI, T., HOSODA, A., OKUDA, T., KAMIGORI, Y., NOMURA-FURUWATARI, C., KIMATA, Y., TSURU, A., and KOHNO, K.** 2001. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol* **3**:158-164.
85. **JAGUS, R., JOSHI, B., and BARBER, G.N.** 1999. PKR, apoptosis and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **31**:123-138.
86. **JANUS, F., ALBRECHTSEN, N., DORNREITER, I., WIESMULLER, L., GROSSE, F., DEPPERT, W.** 1999. The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci* **55**: 12-27
87. **JOACHIMS, M., VAN BREUGEL, P.C., and LLOYD, R.E.** 1999. Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J Virol* **73**:718-727.
88. **KATAOKA, T., and TSCHOPP, J.** 2004. N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol* **24**:2627-2636.
89. **KATAYAMA, Y., SAKAI, A., OUE, N., ASAOKU, H., OTSUKI, T., SHIOMOMURA, T., MASUDA, R., HINO, N., TAKIMOTO, Y., IMANAKA, F., YASUI, W., and KIMURA, A.** 2003. A possible role for the loss of CD27-CD70 interaction in myelomagenesis. *Br J Haematol* **120**:223-234.
90. **KAUFMAN, R.J.** 1999. Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11693-11695.
91. **KAUFMANN, T., SCHLIPF, S., SANZ, J., NEUBERT, K., STEIN, R., and BORNER, C.** 2003. Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* **160**:53-64.
92. **KELEKAR, A., and THOMPSON, C.B.** 1998. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* **8**:324-330.
93. **KEREKATTE, V., KEIPER, B.D., BADORFF, C., CAI, A., KNOWLTON, K.U., and RHOADS, R.E.** 1999. Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J Virol* **73**:709-717.

94. **KHATIB, R., CHASON, J.L., SILBERBERG, B.K., and LERNER, A.M.** 1980. Age-dependent pathogenicity of group B coxsackieviruses in Swiss-Webster mice: infectivity for myocardium and pancreas. *J Infect Dis* **141**:394-403.
95. **KIM, K.S., TRACY, S., TAPPRICH, W., BAILEY, J., LEE, C.K., KIM, K., BARRY, W.H., and CHAPMAN, N.M.** 2005. 5'-Terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-strand viral RNA. *J Virol* **79**:7024-7041.
96. **KISCHKEL, F.C., LAWRENCE, D.A., TINEL, A., LEBLANC, H., VIRMANI, A., SCHOW, P., GAZDAR, A., BLENIS, J., ARNOTT, D., and ASHKENAZI, A.** 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* **276**:46639-46646.
97. **KNOWLTON, K.U., JEON, E.S., BERKLEY, N., WESSELY, R., and HUBER, S.** 1996. A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *J Virol* **70**:7811-7818.
98. **KUHL, U., PAUSCHINGER, M., SCHWIMMBECK, P.L., SEEBERG, B., LOBER, C., NOUTSIAS, M., POLLER, W., and SCHULTHEISS, H.P.** 2003. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* **107**:2793-2798.
99. **KUMAR, A., YANG, Y.L., FLATI, V., DER, S., KADEREIT, S., DEB, A., HAQUE, J., REIS, L., WEISSMANN, C., and WILLIAMS, B.R.** 1997. Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB. *Embo J* **16**:406-416.
100. **KUO, R.L., KUNG, S.H., HSU, Y.Y., and LIU, W.T.** 2002. Infection with enterovirus 71 or expression of its 2A protease induces apoptotic cell death. *J Gen Virol* **83**:1367-1376.
101. **KUYUMCU-MARTINEZ, N.M., JOACHIMS, M., and LLOYD, R.E.** 2002. Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J Virol* **76**:2062-2074.
102. **LAVRIK, I., KRUEGER, A., SCHMITZ, I., BAUMANN, S., WEYD, H., KRAMMER, P.H., and KIRCHHOFF, S.** 2003. The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ* **10**:144-145.
103. **LAVRIK, I.N., GOLKS, A., and KRAMMER, P.H.** 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* **115**:2665-2672.
104. **LAZEBNIK, Y.A., KAUFMANN, S.H., DESNOYERS, S., POIRIER, G.G., and EARNSHAW, W.C.** 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**:346-347.
105. **LEVIN, D., and LONDON, I.M.** 1978. Regulation of protein synthesis: activation by double-stranded RNA of a protein kinase that phosphorylates eukaryotic initiation factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:1121-1125.
106. **LI, H., ZHU, H., XU, C.J., and YUAN, J.** 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**:491-501.
107. **LI, L.Y., LUO, X., and WANG, X.** 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**:95-99.
108. **LI, M.L., HSU, T.A., CHEN, T.C., CHANG, S.C., LEE, J.C., CHEN, C.C., STOLLAR, V., and SHIH, S.R.** 2002. The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis. *Virology* **293**:386-395.
109. **LIU, J., WEI, T., and KWANG, J.** 2002. Avian encephalomyelitis virus induces apoptosis via major structural protein VP3. *Virology* **300**:39-49.
110. **LIU, J., WEI, T., and KWANG, J.** 2004. Avian encephalomyelitis virus nonstructural protein 2C induces apoptosis by activating cytochrome c/caspase-9 pathway. *Virology* **318**:169-182.
111. **LIU, X., KIM, C.N., YANG, J., JEMMERSON, R., and WANG, X.** 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**:147-157.
112. **LIU, X., ZOU, H., SLAUGHTER, C., and WANG, X.** 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**:175-184.

113. **LOPEZ-GUERRERO, J.A., ALONSO, M., MARTIN-BELMONTE, F., and CARRASCO, L.** 2000. Poliovirus induces apoptosis in the human U937 promonocytic cell line. *Virology* **272**:250-256.
114. **LOUDON, R.P., MORASKA, A.F., HUBER, S.A., SCHWIMMBECK, P., and SCHULTHEISS, P.** 1991. An attenuated variant of Coxsackievirus B3 preferentially induces immunoregulatory T cells in vivo. *J Virol* **65**:5813-5819.
115. **LUO, X., BUDIHARDJO, I., ZOU, H., SLAUGHTER, C., and WANG, X.** 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**:481-490.
116. **MAISCH, B.** 1998. [Classification of cardiomyopathies according to the WHO/ISFC Task Force--more questions than answers?]. *Med Klin (Munich)* **93**:199-209.
117. **MARCHENKO, N.D., ZAIKA, A., and MOLL, U.M.** 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* **275**:16202-16212.
118. **MARTINO, T.A., LIU, P., and SOLE, M.J.** 1994. Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res* **74**:182-188.
119. **MARTINO, T.A., SOLE, M.J., PENN, L.Z., LIEW, C.C., and LIU, P.** 1993. Quantitation of enteroviral RNA by competitive polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **31**:2634-2640.
120. **MARTINOU, J.C., and GREEN, D.R.** 2001. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:63-67.
121. **MATE, M.J., ORTIZ-LOMBARDIA, M., BOITEL, B., HAOUZ, A., TELLO, D., SUSIN, S.A., PENNINGER, J., KROEMER, G., and ALZARI, P.M.** 2002. The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol* **9**:442-446.
122. **MCCULLOUGH, K.D., MARTINDALE, J.L., KLOTZ, L.O., AW, T.Y., and HOLBROOK, N.J.** 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* **21**:1249-1259.
123. **MELNICK, J.L., SHAW, E.W., and CURNEN, E.C.** 1949. A virus from patients diagnosed as non-paralytic poliomyelitis or aseptic meningitis. *Proc Soc Exp Biol Med* **71**:344-349.
124. **MICHEAU, O., THOME, M., SCHNEIDER, P., HOLLER, N., TSCHOPP, J., NICHOLSON, D.W., BRIAND, C., and GRUTTER, M.G.** 2002. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **277**:45162-45171.
125. **MODROW, S., FALKE, D., and TRUYEN, U.** 2003. *Molekulare Virologie*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
126. **MORONI, M.C., HICKMAN, E.S., LAZZERINI DENCHI, E., CAPRARA, G., COLLI, E., CECCONI, F., MULLER, H., and HELIN, K.** 2001. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* **3**:552-558.
127. **MUCKELBAUER, J.K., KREMER, M., MINOR, I., TONG, L., ZLOTNICK, A., JOHNSON, J.E., and ROSSMANN, M.G.** 1995. Structure determination of coxsackievirus B3 to 3.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **51**:871-887.
<http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/picornaviridae/SequenceDatabase/3Ddatabase/enterovirus-3d.htm>
128. **NAKAGAWA, T., and YUAN, J.** 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* **150**:887-894.
129. **NAKAGAWA, T., ZHU, H., MORISHIMA, N., LI, E., XU, J., YANKNER, B.A., and YUAN, J.** 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**:98-103.
130. **NAKANO, K., and VOUSDEN, K.H.** 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**:683-694.
131. **NESTLER, M., MARTIN, U., HORTSCHANSKY, P., SALUZ, H.P., HENKE, A., and MUNDER, T.** 2006. The zinc containing pro-apoptotic protein siva interacts with the peroxisomal membrane protein pmp22. *Mol Cell Biochem* **287**:147-155.

132. **NEZNANOV, N., KONDRATOVA, A., CHUMAKOV, K.M., ANGRES, B., ZHUMABAYEVA, B., AGOL, V.I., and GUDKOV, A.V.** 2001. Poliovirus protein 3A inhibits tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis by eliminating the TNF receptor from the cell surface. *J Virol* **75**:10409-10420.
133. **NICHOLSON, D.W.** 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**:1028-1042.
134. **O'BRIEN, V.** 1998. Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* **79 (Pt 8)**:1833-1845.
135. **O'REILLY, L.A., EKERT, P., HARVEY, N., MARSDEN, V., CULLEN, L., VAUX, D.L., HACKER, G., MAGNUSSON, C., PAKUSCH, M., CECCONI, F., KUIDA, K., STRASSER, A., HUANG, D.C., and KUMAR, S.** 2002. Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. *Cell Death Differ* **9**:832-841.
136. **OBERHAMMER, F., WILSON, J.W., DIVE, C., MORRIS, I.D., HICKMAN, J.A., WAKELING, A.E., WALKER, P.R., and SIKORSKA, M.** 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *Embo J* **12**:3679-3684.
137. **ODA, E., OHKI, R., MURASAWA, H., NEMOTO, J., SHIBUE, T., YAMASHITA, T., TOKINO, T., TANIGUCHI, T., and TANAKA, N.** 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**:1053-1058.
138. **OLIVETTI, G., ABBI, R., QUAINI, F., KAJSTURA, J., CHENG, W., NITAHARA, J.A., QUAINI, E., DI LORETO, C., BELTRAMI, C.A., KRAJEWSKI, S., REED, J.C., and ANVERSA, P.** 1997. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* **336**:1131-1141.
139. **OWEN-SCHAUB, L.B., ZHANG, W., CUSACK, J.C., ANGELO, L.S., SANTEE, S.M., FUJIWARA, T., ROTH, J.A., DEISSEROTH, A.B., ZHANG, W.W., KRUZEL, E., and ET AL.** 1995. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* **15**:3032-3040.
140. **PARONI, G., HENDERSON, C., SCHNEIDER, C., and BRANCOLINI, C.** 2002. Caspase-2 can trigger cytochrome C release and apoptosis from the nucleus. *J Biol Chem* **277**:15147-15161.
141. **PARRISH, J., LI, L., KLOTZ, K., LEDWICH, D., WANG, X., and XUE, D.** 2001. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* **412**:90-94.
142. **PATIL, C., and WALTER, P.** 2001. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* **13**:349-355.
143. **PEMOV, A., BAVYKIN, S., and HAMLIN, J.L.** 1998. Attachment to the nuclear matrix mediates specific alterations in chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:14757-14762.
144. **POLYAK, K., XIA, Y., ZWEIER, J.L., KINZLER, K.W., and VOGELSTEIN, B.** 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**:300-305.
145. **POUKKULA, M., KAUNISTO, A., HIETAKANGAS, V., DENESSIOUK, K., KATAJAMAKI, T., JOHNSON, M.S., SISTONEN, L., and ERIKSSON, J.E.** 2005. Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail. *J Biol Chem* **280**:27345-27355.
146. **PRASAD, K.V., AO, Z., YOON, Y., WU, M.X., RIZK, M., JACQUOT, S., and SCHLOSSMAN, S.F.** 1997. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6346-6351.
147. **PY, B., SLOMIANNY, C., AUBERGER, P., PETIT, P.X., and BENICHO, S.** 2004. Siva-1 and an alternative splice form lacking the death domain, Siva-2, similarly induce apoptosis in T lymphocytes via a caspase-dependent mitochondrial pathway. *J Immunol* **172**:4008-4017.
148. **RAMSINGH, A., SLACK, J., SILKWORTH, J., and HIXSON, A.** 1989. Severity of disease induced by a pancreatic Cocksackie B4 virus correlates with the H-2Kq locus of the major histocompatibility complex. *Virus Res* **14**:347-358.
149. **RANO, T.A., TIMKEY, T., PETERSON, E.P., ROTONDA, J., NICHOLSON, D.W., BECKER, J.W., CHAPMAN, K.T., and THORNBERRY, N.A.** 1997. A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). *Chem Biol* **4**:149-155.

150. **RAO, R.V., CASTRO-OBREGON, S., FRANKOWSKI, H., SCHULER, M., STOKA, V., DEL RIO, G., BREDESEN, D.E., and ELLERBY, H.M.** 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* **277**:21836-21842.
151. **RAO, R.V., HERMEL, E., CASTRO-OBREGON, S., DEL RIO, G., ELLERBY, L.M., ELLERBY, H.M., and BREDESEN, D.E.** 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* **276**:33869-33874.
152. **RASSMANN, A., HENKE, A., ZOBAWA, M., CARLSOHN, M., SALUZ, H.P., GRABLEY, S., LOTTSPEICH, F., and MUNDER, T.** 2006. Proteome alterations in human host cells infected with coxsackievirus B3. *J Gen Virol* **87**:2631-2638.
153. **REED, J.C.** 2002. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* **1**:111-121.
154. **REED, L. and MUENCH, H.** 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Amer J Hyg* **27**:493-497
155. **RIEDL, S.J., RENATUS, M., SCHWARZENBACHER, R., ZHOU, Q., SUN, C., FESIK, S.W., LIDDINGTON, R.C., and SALVESEN, G.S.** 2001. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* **104**:791-800.
156. **RIPPO, M.R., MALISAN, F., RAVAGNAN, L., TOMASSINI, B., CONDO, I., COSTANTINI, P., SUSIN, S.A., RUFINI, A., TODARO, M., KROEMER, G., and TESTI, R.** 2000. GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. *Faseb J* **14**:2047-2054.
157. **ROMANOVA, L.I., BELOV, G.A., LIDSKY, P.V., TOLSKAYA, E.A., KOLESNIKOVA, M.S., EVSTAFIEVA, A.G., VARTAPETIAN, A.B., EGGER, D., BIENZ, K., and AGOL, V.I.** 2005. Variability in apoptotic response to poliovirus infection. *Virology* **331**:292-306.
158. **ROSSMANN, M.G.** 1989. The structure of antiviral agents that inhibit uncoating when complexed with viral capsids. *Antiviral Res* **11**:3-13.
159. **ROTHER, M., SARMA, V., DIXIT, V.M., and GOEDDEL, D.V.** 1995. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* **269**:1424-1427.
160. **ROTHER, M., WONG, S.C., HENZEL, W.J., and GOEDDEL, D.V.** 1994. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**:681-692.
161. **ROULSTON, A., MARCELLUS, R.C., and BRANTON, P.E.** 1999. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* **53**:577-628.
162. **RUBIO, N., MARTIN-CLEMENTE, B., and LIPTON, H.L.** 2003. High-neurovirulence GDVII virus induces apoptosis in murine astrocytes through tumor necrosis factor (TNF)-receptor and TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Virology* **311**:366-375.
163. **SAKAHIRA, H., ENARI, M., and NAGATA, S.** 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**:96-99.
164. **SAKAHIRA, H., ENARI, M., OHSAWA, Y., UCHIYAMA, Y., and NAGATA, S.** 1999. Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Curr Biol* **9**:543-546.
165. **SALAKO, M.A., CARTER, M.J., and KASS, G.E.** 2006. Coxsackievirus protein 2BC blocks host cell apoptosis by inhibiting caspase-3. *J Biol Chem* **281**:16296-16304.
166. **SALVESEN, G.S., and DUCKETT, C.S.** 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:401-410.
167. **SAWYER, M.H.** 1999. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Pediatr Infect Dis J* **18**:1033-1039; quiz 1040.
168. **SCAFFIDI, C., FULDA, S., SRINIVASAN, A., FRIESEN, C., LI, F., TOMASELLI, K.J., DEBATIN, K.M., KRAMMER, P.H., and PETER, M.E.** 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**:1675-1687.
169. **SCAFFIDI, C., MEDEMA, J.P., KRAMMER, P.H., and PETER, M.E.** 1997. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* **272**:26953-26958.
170. **SCHOTTE, P., DECLERCQ, W., VAN HUFFEL, S., VANDENABEELE, P., and BEYAERT, R.** 1999. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett* **442**:117-121.

171. **SCHOTTE, P., VAN CRIEKINGE, W., VAN DE CRAEN, M., VAN LOO, G., DESMEDT, M., GROOTEN, J., CORNELISSEN, M., DE RIDDER, L., VANDEKERCKHOVE, J., FIER, W., VANDENABEELE, P., and BEYAERT, R.** 1998. Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochem Biophys Res Commun* **251**:379-387.
172. **SCHULER, M., and GREEN, D.R.** 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* **29**:684-688.
173. **SCHULTHEISS, H.P., PAUSCHINGER, M., and KUH, U.** 1998. [Pathogenesis of inflammatory cardiomyopathies]. *Med Klin (Munich)* **93**:229-235.
174. **SEIPELT, J., GUARNE, A., BERGMANN, E., JAMES, M., SOMMERGRUBER, W., FITA, I., and SKERN, T.** 1999. The structures of picornaviral proteinases. *Virus Res* **62**:159-168.
175. **SHAFREN, D.R., BATES, R.C., AGREZ, M.V., HERD, R.L., BURNS, G.F., and BARRY, R.D.** 1995. Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J Virol* **69**:3873-3877.
176. **SHI, Y.** 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **9**:459-470.
177. **SHIEH, S.Y., IKEDA, M., TAYA, Y., and PRIVES, C.** 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**:325-334.
178. **SIONOV, R.V., and HAUPT, Y.** 1999. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**:6145-6157.
179. **SLEE, E.A., ADRAIN, C., and MARTIN, S.J.** 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* **276**:7320-7326.
180. **SLEE, E.A., HARTE, M.T., KLUCK, R.M., WOLF, B.B., CASIANO, C.A., NEWMAYER, D.D., WANG, H.G., REED, J.C., NICHOLSON, D.W., ALNEMRI, E.S., GREEN, D.R., and MARTIN, S.J.** 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* **144**:281-292.
181. **SLIFKA, M.K., PAGARIGAN, R., MENA, I., FEUER, R., and WHITTON, J.L.** 2001. Using recombinant coxsackievirus B3 to evaluate the induction and protective efficacy of CD8+ T cells during picornavirus infection. *J Virol* **75**:2377-2387.
182. **SMITH, C.A., FARRAH, T., and GOODWIN, R.G.** 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**:959-962.
183. **SPINICELLI, S., NOCENTINI, G., RONCHETTI, S., KRAUSZ, L.T., BIANCHINI, R., and RICCARDI, C.** 2002. GITR interacts with the pro-apoptotic protein Siva and induces apoptosis. *Cell Death Differ* **9**:1382-1384.
184. **SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., GUO, Y., ZHAN, Y., LAZEBNIK, Y., FERNANDES-ALNEMRI, T., and ALNEMRI, E.S.** 1999. Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. *Cancer Res* **59**:999-1002.
185. **SRINIVASULA, S.M., DATTA, P., FAN, X.J., FERNANDES-ALNEMRI, T., HUANG, Z., and ALNEMRI, E.S.** 2000. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem* **275**:36152-36157.
186. **SRINIVASULA, S.M., HEGDE, R., SALEH, A., DATTA, P., SHIOZAKI, E., CHAI, J., LEE, R.A., ROBBINS, P.D., FERNANDES-ALNEMRI, T., SHI, Y., and ALNEMRI, E.S.** 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**:112-116.
187. **STOKA, V., TURK, B., SCHENDEL, S.L., KIM, T.H., CIRMAN, T., SNIPAS, S.J., ELLERBY, L.M., BREDESEN, D., FREEZE, H., ABRAHAMSON, M., BROMME, D., KRAJEWSKI, S., REED, J.C., YIN, X.M., TURK, V., and SALVESEN, G.S.** 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* **276**:3149-3157.
188. **SUSIN, S.A., DAUGAS, E., RAVAGNAN, L., SAMEJIMA, K., ZAMZAMI, N., LOEFFLER, M., COSTANTINI, P., FERRI, K.F., IRINOPOULOU, T., PREVOST, M.C., BROTHERS, G., MAK, T.W., PENNINGER, J., EARNSHAW, W.C., and KROEMER, G.** 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **192**:571-580.

189. **SUSIN, S.A., LORENZO, H.K., ZAMZAMI, N., MARZO, I., SNOW, B.E., BROTHERS, G.M., MANGION, J., JACOTOT, E., COSTANTINI, P., LOEFFLER, M., LAROCLETTE, N., GOODLETT, D.R., AEBERSOLD, R., SIDEROVSKI, D.P., PENNINGER, J.M., and KROEMER, G.** 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**:441-446.
190. **SUZUKI, Y., IMAI, Y., NAKAYAMA, H., TAKAHASHI, K., TAKIO, K., and TAKAHASHI, R.** 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**:613-621.
191. **TAKADA, H., KISHIMOTO, C., and HIRAOKA, Y.** 1995. Therapy with immunoglobulin suppresses myocarditis in a murine coxsackievirus B3 model. Antiviral and anti-inflammatory effects. *Circulation* **92**:1604-1611.
192. **TAM, P.E., and MESSNER, R.P.** 1999. Molecular mechanisms of coxsackievirus persistence in chronic inflammatory myopathy: viral RNA persists through formation of a double-stranded complex without associated genomic mutations or evolution. *J Virol* **73**:10113-10121.
193. **TARTAGLIA, L.A., AYRES, T.M., WONG, G.H., and GOEDEL, D.V.** 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**:845-853.
194. **TAYLOR, L.A., CARTHY, C.M., YANG, D., SAAD, K., WONG, D., SCHREINER, G., STANTON, L.W., and MCMANUS, B.M.** 2000. Host gene regulation during coxsackievirus B3 infection in mice: assessment by microarrays. *Circ Res* **87**:328-334.
195. **TEODORO, J.G., and BRANTON, P.E.** 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* **71**:1739-1746.
196. **THORNBERRY, N.A., and LAZEBNIK, Y.** 1998. Caspases: enemies within. *Science* **281**:1312-1316.
197. **THORNBERRY, N.A., RANO, T.A., PETERSON, E.P., RASPER, D.M., TIMKEY, T., GARCIA-CALVO, M., HOUTZAGER, V.M., NORDSTROM, P.A., ROY, S., VAILLANCOURT, J.P., CHAPMAN, K.T., and NICHOLSON, D.W.** 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**:17907-17911.
198. **TINEL, A., and TSCHOPP, J.** 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* **304**:843-846.
199. **TOLSKAYA, E.A., ROMANOVA, L.I., KOLESNIKOVA, M.S., IVANNIKOVA, T.A., SMIRNOVA, E.A., RAIKHLIN, N.T., and AGOL, V.I.** 1995. Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J Virol* **69**:1181-1189.
200. **TOMKO, R.P., XU, R., and PHILIPSON, L.** 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3352-3356.
201. **TSCHOPP, J., IRMLER, M., and THOME, M.** 1998. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* **10**:552-558.
202. **TULIN, A., and SPRADLING, A.** 2003. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science* **299**:560-562.
203. **URANO, F., WANG, X., BERTOLOTTI, A., ZHANG, Y., CHUNG, P., HARDING, H.P., and RON, D.** 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**:664-666.
204. **VAN HOUTEN, N., BOUCHARD, P.E., MORASKA, A., and HUBER, S.A.** 1991. Selection of an attenuated Coxsackievirus B3 variant, using a monoclonal antibody reactive to myocyte antigen. *J Virol* **65**:1286-1290.
205. **VAN KUPPEVELD, F.J., HOENDEROP, J.G., SMEETS, R.L., WILLEMS, P.H., DIJKMAN, H.B., GALAMA, J.M., and MELCHERS, W.J.** 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *Embo J* **16**:3519-3532.
206. **VAN KUPPEVELD, F.J., DE JONG, A.S., MELCHERS, W.J., and WILLEMS, P.H.** 2005. Enterovirus protein 2B po(u)res out the calcium: a viral strategy to survive? *TRENDS Microbiol* **13**:41-44

-
207. **VAN LOO, G., SCHOTTE, P., VAN GURP, M., DEMOL, H., HOORELBEKE, B., GEVAERT, K., RODRIGUEZ, I., RUIZ-CARRILLO, A., VANDEKERCKHOVE, J., DECLERCQ, W., BEYAERT, R., and VANDENABEELE, P.** 2001. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* **8**:1136-1142.
208. **VEDRENNE, C., KLOPFENSTEIN, D.R., and HAURI, H.P.** 2005. Phosphorylation controls CLIMP-63-mediated anchoring of the endoplasmic reticulum to microtubules. *Mol Biol Cell* **16**:1928-1937.
209. **VERHAGEN, A.M., EKERT, P.G., PAKUSCH, M., SILKE, J., CONNOLLY, L.M., REID, G.E., MORITZ, R.L., SIMPSON, R.J., and VAUX, D.L.** 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**:43-53.
210. **VERHAGEN, A.M., SILKE, J., EKERT, P.G., PAKUSCH, M., KAUFMANN, H., CONNOLLY, L.M., DAY, C.L., TIKOO, A., BURKE, R., WROBEL, C., MORITZ, R.L., SIMPSON, R.J., and VAUX, D.L.** 2002. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* **277**:445-454.
211. **VOGELSTEIN, B., LANE, D., and LEVINE, A.J.** 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408**:307-310.
212. **WANG, H.G., PATHAN, N., ETHELL, I.M., KRAJEWSKI, S., YAMAGUCHI, Y., SHIBASAKI, F., MCKEON, F., BOBO, T., FRANKE, T.F., and REED, J.C.** 1999. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**:339-343.
213. **WANG, J., CHUN, H.J., WONG, W., SPENCER, D.M., and LENARDO, M.J.** 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13884-13888.
214. **WANG, X.** 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**:2922-2933.
215. **WANG, X.W., VERMEULEN, W., COURSEN, J.D., GIBSON, M., LUPOLD, S.E., FORRESTER, K., XU, G., ELMORE, L., YEH, H., HOEIJMAKERS, J.H., and HARRIS, C.C.** 1996. The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev* **10**:1219-1232.
216. **WANG, Z.Q., STINGL, L., MORRISON, C., JANTSCH, M., LOS, M., SCHULZE-OSTHOFF, K., and WAGNER, E.F.** 1997. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev* **11**:2347-2358.
217. **WEIDMAN, M.K., YALAMANCHILI, P., NG, B., TSAI, W., and DASGUPTA, A.** 2001. Poliovirus 3C protease-mediated degradation of transcriptional activator p53 requires a cellular activity. *Virology* **291**:260-271.
218. **WESSELY, R., KLINGEL, K., SANTANA, L.F., DALTON, N., HONGO, M., JONATHAN LEDERER, W., KANDOLF, R., and KNOWLTON, K.U.** 1998. Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* **102**:1444-1453.
219. **WHITFIELD, J., NEAME, S.J., PAQUET, L., BERNARD, O., and HAM, J.** 2001. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* **29**:629-643.
220. **WHITTON, J.L.** 2002. Immunopathology during coxsackievirus infection. *Springer Semin Immunopathol* **24**:201-213.
221. **WU, G.S., BURNS, T.F., MCDONALD, E.R., 3RD, JIANG, W., MENG, R., KRANTZ, I.D., KAO, G., GAN, D.D., ZHOU, J.Y., MUSCHEL, R., HAMILTON, S.R., SPINNER, N.B., MARKOWITZ, S., WU, G., and EL-DEIRY, W.S.** 1997. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* **17**:141-143.
222. **XUE, L., CHU, F., CHENG, Y., SUN, X., BORTHAKUR, A., RAMARAO, M., PANDEY, P., WU, M., SCHLOSSMAN, S.F., and PRASAD, K.V.** 2002. Siva-1 binds to and inhibits BCL-X(L)-mediated protection against UV radiation-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:6925-6930.
223. **YALAMANCHILI, P., DATTA, U., and DASGUPTA, A.** 1997. Inhibition of host cell transcription by poliovirus: cleavage of transcription factor CREB by poliovirus-encoded protease 3Cpro. *J Virol* **71**:1220-1226.

224. **YALAMANCHILI, P., HARRIS, K., WIMMER, E., and DASGUPTA, A.** 1996. Inhibition of basal transcription by poliovirus: a virus- encoded protease (3Cpro) inhibits formation of TBP-TATA box complex in vitro. *J Virol* **70**:2922-2929.
225. **YALAMANCHILI, P., WEIDMAN, K., and DASGUPTA, A.** 1997. Cleavage of transcriptional activator Oct-1 by poliovirus encoded protease 3Cpro. *Virology* **239**:176-185.
226. **YANG, Q.H., CHURCH-HAJDUK, R., REN, J., NEWTON, M.L., and DU, C.** 2003. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* **17**:1487-1496.
227. **YE, H., CANDE, C., STEPHANOU, N.C., JIANG, S., GURBUXANI, S., LAROCLETTE, N., DAUGAS, E., GARRIDO, C., KROEMER, G., and WU, H.** 2002. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* **9**:680-684.
228. **YEUNG, M.C., CHANG, D.L., CAMANTIGUE, R.E., and LAU, A.S.** 1999. Inhibitory role of the host apoptogenic gene PKR in the establishment of persistent infection by encephalomyocarditis virus in U937 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11860-11865.
229. **YIN, X.M., OLTVAI, Z.N., and KORSMEYER, S.J.** 1994. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* **369**:321-323.
230. **YIN, X.M., WANG, K., GROSS, A., ZHAO, Y., ZINKEL, S., KLOCKE, B., ROTH, K.A., and KORSMEYER, S.J.** 1999. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **400**:886-891.
231. **YONEDA, T., IMAIZUMI, K., OONO, K., YUI, D., GOMI, F., KATAYAMA, T., and TOHYAMA, M.** 2001. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* **276**:13935-13940.
232. **YOON, Y., AO, Z., CHENG, Y., SCHLOSSMAN, S.F., and PRASAD, K.V.** 1999. Murine Siva-1 and Siva-2, alternate splice forms of the mouse Siva gene, both bind to CD27 but differentially transduce apoptosis. *Oncogene* **18**:7174-7179.
233. **YU, J., ZHANG, L., HWANG, P.M., KINZLER, K.W., and VOGELSTEIN, B.** 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **7**:673-682.
234. **ZAMORA, M., MARISSSEN, W.E., and LLOYD, R.E.** 2002. Multiple eIF4GI-specific protease activities present in uninfected and poliovirus-infected cells. *J Virol* **76**:165-177.
235. **ZAMZAMI, N., and KROEMER, G.** 2001. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:67-71.
236. **ZAUTNER, A.E., JAHN, B., HAMMERSCHMIDT, E., WUTZLER, P., and SCHMIDTKE, M.** 2006. N- and 6-O-sulfated heparan sulfates mediate internalization of coxsackievirus B3 variant PD into CHO-K1 cells. *J Virol* **80**:6629-6636.
237. **ZAUTNER, A.E., KORNER, U., HENKE, A., BADORFF, C., and SCHMIDTKE, M.** 2003. Heparan sulfates and coxsackievirus-adenovirus receptor: each one mediates coxsackievirus B3 PD infection. *J Virol* **77**:10071-10077.
238. **ZHA, J., HARADA, H., YANG, E., JOCKEL, J., and KORSMEYER, S.J.** 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**:619-628.
239. **ZHANG, H., MORGAN-CAPNER, P., LATIF, N., PANDOLFINO, Y.A., FAN, W., DUNN, M.J., and ARCHARD, L.C.** 1997. Coxsackievirus B3-induced myocarditis. Characterization of stable attenuated variants that protect against infection with the cardiocirulent wild-type strain. *Am J Pathol* **150**:2197-2207.
240. **ZHANG, X.D., FRANCO, A.V., NGUYEN, T., GRAY, C.P., and HERSEY, P.** 2000. Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol* **164**:3961-3970.
241. **ZONG, W.X., LI, C., HATZIVASSILIOU, G., LINDSTEN, T., YU, Q.C., YUAN, J., and THOMPSON, C.B.** 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* **162**:59-69.
242. **ZOU, H., LI, Y., LIU, X., and WANG, X.** 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**:11549-11556.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. A. Stelzner für die Übernahme der Betreuung und die Begleitung während der Erstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Wutzler und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts danke ich für die Schaffung der guten experimentellen Rahmenbedingungen. Ein besonderer Dank für die freundliche Unterstützung geht an Dr. Eckhardt Birch-Hirschfeld für die Synthese der Primer, Veronika Güntzschel für die unkomplizierte Hilfe bei Zellkulturarbeiten sowie an PD Dr. Roland Zell und Dr. Michaela Schmidtke und ihre Arbeitsgruppen für die Kooperation bei DNA-Sequenzierungen und hilfreiche Hinweise.

Ein „Danke“ auch an PD Dr. Thomas Munder, Dr. Matthias Nestler und Katharina Mihatsch für die gute und kooperative Zusammenarbeit im Rahmen unseres Projekts.

Dr. Joachim Seipelt (Institut für Medizinische Biochemie, Medizinische Universität Wien) danke ich für die bereitwillige Übersendung gereinigter coxsackieviraler 2A-Protease, ebenso wie Dr. Michael Knop (Europäisches Labor für Molekularbiologie Heidelberg) für die Überlassung der DsRedStar-kodierenden DNA. Auch bei André Güllmar (Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie, FSU Jena) möchte ich mich für seine nette Unterstützung bei der Arbeit am konfokalen Laserscanningmikroskop bedanken.

Eine ganz besondere Bedeutung für das Gelingen dieser Dissertation hatte die außergewöhnliche Arbeitsatmosphäre in der Abteilung meines Betreuers PD Dr. Andreas Henke, die maßgeblich durch seine freundliche und respektvolle Begleitung, seine Geduld und Hilfe in fachlicher und persönlicher Hinsicht geprägt ist. Für allen bemerkten und nicht bemerkten Beistand – herzlichen Dank!

Mein Dank geht ebenso an Nadine Wiesener, Heike Urban und Beate Menzel für die vergnüglichen Momente bei der Arbeit und in ganz besonderer Weise an Nadine Jarasch und Martin Czolbe – Dankeschön Euch beiden!

Bei meiner Familie – Ursula und Rolf Martin, Kristina Martin und Carsten Sachse – kann ich mich nicht genug bedanken – für ihre Liebe, ihren Humor und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

THESEN ZUR DISSERTATION

von Dipl.-Biochem. Ulrike Martin

„Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese von Coxsackievirus B3-Infektionen“

Die Bedeutung der Apoptose im Verlauf von Picornavirus-Infektionen ist bislang unklar, sowohl eine Induktion als auch eine Suppression des apoptotischen Zelltods werden beschrieben. Die vorliegende Arbeit sollte den Prozess der CVB3-induzierten Apoptose als einen Pathomechanismus der viralen Infektion *in vitro* analysieren.

1. Die Aktivierung der Apoptose während der Infektion von 293-Zellen mit CVB3H3 war anhand der typischen morphologischen Veränderungen der Zellkerne in Form der Chromatinkondensierung und der Fragmentierung der Zellkerne sowie dem Abbau des Chromatins zu Oligo- und Mononukleosomen nachweisbar.
2. Die Aktivierung der Caspase-3, die von zentraler Bedeutung für die Ausführung des apoptotischen Programms ist, wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen und Enzymaktivitätstests detektiert. Dabei erreichte die Caspase-3 ihre maximale Wirksamkeit am Ende des Replikationszyklus.
3. Die Beteiligung sowohl des extrinsischen als auch des intrinsischen Apoptosewegs an der Aktivierung der Caspase-3 konnte durch die frühe Prozessierung entsprechender Initiator-Caspasen (der Caspase-8 bzw. -9) belegt werden, deren Kinetik identisch war. Erstmals wurde damit eine initiale Beteiligung der Caspase-8 im Verlauf einer Enterovirus-induzierten Apoptose gezeigt.
4. Die Induktion des intrinsischen Apoptosewegs unter mitochondrialer Beteiligung konnte weiterhin durch die für die Caspase-9-Aktivierung erforderliche Freisetzung des Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma nachgewiesen werden.
5. Mit Hilfe eines cDNA-Arrays wurde die hochregulierte Transkription zahlreicher Komponenten der extrinsischen apoptotischen Signalkette sichtbar, was ein weiterer Hinweis auf deren Bedeutung im Verlauf der CVB3H3-induzierten Apoptose ist. Weiterhin lässt der Array durch die deutlich erhöhte Transkription von *p53* eine Beteiligung dieses Genprodukts an der Regulation des apoptotischen Zelltods vermuten.

6. Eine Beteiligung des proapoptotischen Wirtszellproteins Siva an den apoptotischen Prozessen der CVB3-Infektion *in vitro* war nicht ersichtlich. Zwar führte die CVB3H3-Infektion zu einer transienten Aktivierung der Transkription von *siva*, was jedoch nicht in einer nachweisbaren Proteinsynthese resultierte. Die Interaktion zwischen dem viralen Kapsidprotein VP2 und Siva scheint demnach im verwendeten experimentellen System für die Induktion der Apoptose nicht von Bedeutung zu sein.
7. Der Vergleich von CVB3H3 mit dem CVB3H310A1-Virus, dessen VP2-Protein nicht zu einer effizienten Wechselwirkung mit Siva fähig ist, ließ ebenfalls keine Rückschlüsse auf eine Funktion von Siva während der Virusreplikation *in vitro* zu. Auch CVB3H310A1 war zur Aktivierung des apoptotischen Programms in der Lage, wobei hinsichtlich morphologischer Zellveränderungen, Caspase-3-Aktivierung und Cytochrom C-Freisetzung kein Hinweis auf einen abweichenden Mechanismus gefunden wurde.
8. Bei der Verwendung des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk erwies sich, dass die antivirale Wirkung nicht durch eine Hemmung der Apoptose, sondern durch die Inaktivierung der coxsackieviralen Proteasen 2A und 3C bedingt war. Dies führte zu einer vollständigen Hemmung der viralen RNA- und Proteinsynthese. Ursache dieser Wirkung von z-VAD-fmk war die Methylierung des Aspartatrests zur Erhöhung der Zellpermeabilität, die erst durch die intrazelluläre Demethylierung des Inhibitors aufgehoben wurde.
9. Mit Hilfe des nicht methylierten pan-Caspase-Inhibitors q-VD-o-Ph konnte gezeigt werden, dass initial Caspase-Aktivitäten an der Freisetzung des Cytochrom C beteiligt sind. Die weiterführende Cytochrom C-Translokation erfolgte durch Caspase-unabhängige intrazelluläre Signale.
10. Durch die Verwendung von q-VD-o-Ph erfolgte ebenfalls der Nachweis, dass apoptotische Prozesse für die effiziente CVB3H3-Replikation *in vitro* von Bedeutung sind. Die Inhibierung der Caspase-Aktivitäten hemmte sowohl die Virusvermehrung an sich als auch die Freisetzung der gebildeten Nachkommenviren.
11. Der fehlende Einfluss von q-VD-o-Ph auf die Ausprägung des zytopathischen Effekts und der damit korrelierenden Zellvitalität verdeutlichte, dass diese Prozesse primär durch die Aktivität der viralen Proteasen und ohne Beteiligung von Caspase-Aktivitäten verursacht wurden.

WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE

PUBLIKATIONEN

- **Jongbloed JD, Martin U, Antelmann H, Hecker M, Tjalsma H, Venema G, Bron S, van Dijk JM, Muller JP.** TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. *J Biol Chem.* 2000 Dec 29; 275 (52): 41350-7.
- **Pop O, Martin U, Abel C, Muller JP.** The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatAd/Cd proteins of *Bacillus subtilis* form an autonomous Tat translocation system. *J Biol Chem.* 2002 Feb 1; 277(5): 3268-73.
- **Henke A, Nestler M, Strunze S, Saluz HP, Hortschansky P, Menzel B, Martin U, Zell R, Stelzner A, Munder T.** The apoptotic capability of coxsackievirus B3 is influenced by the efficient interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic host protein Siva. *Virology.* 2001 Oct 10; 289 (1): 15-22.
- **Henke A, Zell R, Martin U, Stelzner A.** Direct Interferon-gamma-mediated protection caused by a recombinant Coxsackievirus B3. *Virology.* 2003 Oct 25; 315(2): 335-44.
- **Martin U, Nestler M, Munder T, Zell R, Sigusch HH, Henke A.** Characterization of coxsackievirus B3-caused apoptosis under in vitro conditions. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2004 May; 193(2-3):133-9
- **Jarasch N, Martin U, Kamphausen E, Zell R, Wutzler P, Henke A.** Interferon- γ -induced activation of nitric oxide-mediated antiviral activity of macrophages caused by a recombinant coxsackievirus B3. *Viral Immunol.* 2005; 18(2):355-64
- **Nestler M, Martin U, Hortschansky P, Saluz HP, Henke A, Munder T.** The zinc containing pro-apoptotic protein siva interacts with the peroxisomal membrane protein pmp22. *Mol Cell Biochem* 2006, DOI: 10.1007/s11010-005-9082-6
- **Martin U, Jarasch N, Nestler M, Munder T, Seitz S, Zell R, Wutzler P, Henke A.** Antiviral effects of pan-caspase inhibitors on the replication of coxsackievirus B3 (submitted)

POSTERPRÄSENTATIONEN

- **EUROPIC (European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses)**
May 2005, XIIIth Meeting, Lunteren, Niederlande
Martin U, Nestler M, Munder T, Seitz S, Jarasch N, Wutzler P, Henke A. „Influence of the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk on the pathogenesis of coxsackievirus B3“
(Award of the FEMS Young Scientist Meeting Grant)

May 2002, XIIth Meeting, Falmouth, USA
Martin U, Nestler M, Menzel B, Munder T, Stelzner A, Henke A. „Characterization of apoptotic events during coxsackievirus B3 infection“
- **Programmed Cell Death Meeting, September 2001, Cold Spring Harbor, USA**
Nestler M, Strunze S, Martin U, Henke A, Saluz HP, Munder T. „Apoptosis caused by coxsackievirus B3 is mediated through interaction between VP2 and human Siva“

- **Annual Meeting of the German Society of Virology**

München, März 2006

Martin U, Nestler M, Munder T, Jarasch N, Zell R, Wutzler P, Henke A. „Effect of the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk on the viral proteases 2A and 3C and the replication of coxsackievirus B3“

Tübingen, März 2004

Jarasch N, Martin U, Urban H, Zell R, Wutzler P, Henke A. „Direct nitrit oxide-mediated reduction of viral replication caused by a recombinant coxsackievirus B3“

Berlin, März 2003

Martin U, Nestler M, Menzel B, Munder T, Stelzner A, Henke A. „Coxsackievirus B3-linked apoptosis under *in vitro* conditions“

Erlangen, April 2002

Martin U, Nestler M, Menzel B, Munder T, Stelzner A, Henke A. „Characterization of apoptotic events during coxsackievirus B3 infection“

- **Annual Meeting of the German Society of Immunology**

Marburg, September 2002

Martin U, Nestler M, Menzel B, Munder T, Stelzner A, Henke A. „Investigation of coxsackievirus B3-caused apoptosis *in vitro*“

- **Symposium „Mechanismen der Genregulation bei Mikroorganismen“**

Kloster Ohrbeck, Osnabrück, November 1999

Vortrag:

Martin U, Müller J. „Charakterisierung des Δ pH-abhängigen Proteintranslokationsweges in *Bacillus subtilis*“

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Ulrike Martin

Anschrift: Sophienstrasse 27
07743 Jena

Familienstand: ledig, ein Kind

Geburtstag/-ort: 28.05.1975 in Jena

Schul Ausbildung

09/1981 - 06/1990 Polytechnische Oberschule ‚Magnus Poser‘ in Jena

08/1990 - 06/1993 Adolf Reichwein Gymnasium Jena
Abschluss: Abitur

Studium

10/1994 - 11/1999 Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie der FSU Jena:
„Charakterisierung des Δ pH-abhängigen Proteintranslokationsweges in *Bacillus subtilis*“

Abschluss: Diplom

Forschungstätigkeit

09/1999 – 01/2000 Freie Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena, Abteilung Molekulare Ökologie

02/2000 – 10/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Virologie und Antivirale Therapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

03/2003 – 12/2003 Mutterschutz und Erziehungsurlaub

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena vom 19. Oktober 2000 bekannt ist.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde oder Hochschule eingereicht.

Jena, den 17.10.2006

Ulrike Martin